

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 630 029**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/84 (2006.01)

G01N 33/537 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.12.2011** **PCT/US2011/064938**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.06.2012** **WO12082914**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2011** **E 11804867 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.04.2017** **EP 2652511**

54 Título: **Análisis de citometría de flujo de materiales adsorbidos en sales metálicas**

30 Prioridad:

14.12.2010 US 423001 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.08.2017

73 Titular/es:

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA (100.0%)
Rue de l'Institut, 89
1330 Rixensart, BE

72 Inventor/es:

SKIBINSKI, DAVID;
LAERA, DONATELLO;
NUTI, SANDRA y
UGOZZOLI, MILDRED

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 630 029 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Análisis de citometría de flujo de materiales adsorbidos en sales metálicas

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de EE.UU. n.º 61/423.001 (presentada el 14 de diciembre de 2010).

5 **Campo técnico**

La invención se refiere al campo del análisis del material adsorbido, por ejemplo, en vacunas.

Técnica antecedente

10 Los antígenos de vacunas se adsorben frecuentemente en sales metálicas insolubles, tales como hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, para proporcionar un efecto adyuvante. Frecuentemente es necesario analizar antígenos después de su adsorción, pero la propia adsorción puede dificultar el análisis, por ejemplo, como se describe en la referencia 1 para el antígeno superficial de la hepatitis B (HBsAg).

15 En lugar de ensayar los antígenos adsorbidos directamente, muchos ensayos se basan en su lugar en un tratamiento de desorción, seguido por el análisis del antígeno liberado. Por ejemplo, para medir la proporción del antígeno adsorbido, se sabe analizar el antígeno no adsorbido antes y después de un tratamiento de desorción, usando la diferencia para inferir la cantidad de adsorción. En este tipo de ensayo, sin embargo, el requisito para una etapa de desorción es complicado, y esto significa también que el antígeno no se está analizando en la forma en la que se suministra o utiliza realmente.

20 En la referencia 2 se ha notificado la cuantificación directa *in situ* de antígenos adsorbidos por ejemplo, mediante ELISA; o mediante espectroscopía en el infrarrojo cercano en la referencia 3. La referencia 4 divulga un inmunoensayo directo de formulación de alhidrogel ("DAFIA") que se diseña para determinar de forma directa (es decir, sin extracción previa), precisa, sensible, y específica el contenido, identidad e integridad de un antígeno mientras sigue adsorbido en un adyuvante de hidróxido de aluminio.

25 Es un objeto de la invención proporcionar procedimientos adicionales y mejorados para analizar antígenos de vacuna (u otros componentes) que se adsorben en sales metálicas insolubles. Morefield GL y col se refiere a la distribución de antígeno adsorbido en vacunas monovalentes y combinadas. Katz JB y col. presentan una evaluación *in vitro* del contenido de antígeno vírico en vacunas adyuvadas inactivadas con hidróxido de aluminio. Zhu D y col. (Octubre 2009) se refieren al uso de un ensayo de o-ftaldehído para determinar el contenido de proteínas en vacunas basadas en alhidrogel. El documento WO 2007/122373 se refiere a. Maraskovsky E y col. se refieren a la proteína NY-ESO-1 formulada en el adyuvante ISCOMATRIX como una potente vacuna anticancerosa que induce la inmunidad tanto humoral como mediada por linfocitos T CD8+ y la protección frente a los tumores NY-ESO-1+.

Sumario de la invención

35 La invención proporciona un procedimiento para analizar un componente que está adsorbido en una sal metálica insoluble, que comprende las etapas de: (i) marcar el componente adsorbido con un reactivo de unión para producir un componente adsorbido marcado; y (ii) analizar el componente adsorbido marcado mediante citometría de flujo. La invención proporciona también un procedimiento de distribuir una composición que comprende una etapa de control de calidad del análisis de un componente adsorbido utilizando el procedimiento de la invención, en el que los resultados del análisis del componente adsorbido en la sal metálica insoluble determinan si se realizan etapas posteriores en el procedimiento de distribución.

40 La invención proporciona también un procedimiento para fabricar una composición que comprende una etapa de análisis de un componente adsorbido, utilizando un procedimiento de la invención, en el que se analiza una muestra de un lote grande de un componente adsorbido de una sal metálica insoluble y en el que se decide continuar con la fabricación de una composición que incorpora el lote evaluado del componente adsorbido sobre la base de los resultados del análisis de citometría de flujo. La presente invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas. 45 Cualquier materia sujeto identificada en la solicitud como "invención", "realización", "aspecto", etc., que exceda el alcance de la invención que se representa por las reivindicaciones no forma parte de la invención reivindicada sino que sirve solo como información antecedente para comprender mejor la invención.

Sumario

50 La invención utiliza las técnicas e instrumentos que se usan normalmente en la citometría de flujo (CF) como herramienta para analizar los materiales adsorbidos. La invención proporciona en general una manera conveniente de analizar los componentes adsorbidos, lo que permite el análisis de partículas individuales de sales metálicas insolubles con componentes con componentes adsorbidos en las anteriores para determinar sus propiedades, y a partir de ahí determinar las propiedades promedio de una suspensión de estas partículas.

Una suspensión de partículas de sales metálicas insolubles con componente(s) adsorbidos se pasa a través de un

citómetro de flujo para determinar las propiedades de las partículas individuales. En un citómetro de flujo, cada partícula se pasa a través de uno o más haces de luz, normalmente haces láser de la longitud de onda seleccionada. Se colocan numerosos detectores al rededor del(de los) haz(haces) de luz. Un detector está alineado con el haz de luz para detectar la dispersión hacia delante, y uno o más puede(n) ser perpendicular(es) al haz de luz, lo que detecta la dispersión lateral de la partícula. De manera adicional, uno o más detectores se sitúan cerca del haz de luz para detectar la luz emitida desde marcas luminiscentes (por ejemplo, marcas fluorescentes), que puede excitarse por el haz de luz. Normalmente, la longitud de onda de la luz emitida desde la marca luminiscente debe diferir de la longitud de onda del haz de luz que incide sobre la partícula, para asegurar la detección específica de la marca. El grado de dispersión de luz procedente de la partícula permite determinar el tamaño y la morfología de la partícula. El detector de luminiscencia permite la detección de componentes específicos adsorbidos en la partícula mediante la emisión de una determinada longitud de onda procedente de una marca unida al componente adsorbido. Utilizando múltiples marcas, cada una de las cuales emite una longitud de onda de luz diferente, y cada una de las cuales es específica de un único componente, se pueden analizar de forma simultánea múltiples componentes adsorbidos en una única suspensión de partículas de sales metálicas insolubles.

Se divulga en el presente documento la citometría de flujo para el análisis de los componentes adsorbidos en una sal metálica insoluble. A fin de permitir la detección mediante el citómetro de flujo, el componente debe estar marcado. En algunas realizaciones, el componente adsorbido contiene una marca intrínseca. En otras realizaciones, se añade una marca detectable mediante un reactivo de unión. de esta manera, la invención proporciona un procedimiento para analizar un componente que está adsorbido en una sal metálica insoluble, que comprende las etapas de: (i) marcar el componente adsorbido con un reactivo de unión para producir un componente adsorbido marcado; y (ii) analizar el componente adsorbido marcado mediante citometría de flujo.

Este procedimiento es ventajoso sobre muchos de los procedimientos de la técnica anterior ya que no desorbe necesariamente el componente que está absorbido en la sal metálica insoluble. En su lugar, se puede analizar el componente adsorbido mientras sigue unido a la sal metálica insoluble. Además de eliminar la necesidad de la desorción, el análisis *in situ* puede permitir también, en algunas circunstancias, la determinación de la actividad del componente adsorbido.

Se divulga también un citómetro de flujo que comprende un componente marcado adsorbido en una sal metálica insoluble. Se divulga también un tubo de muestra para citómetro que comprende un componente marcado adsorbido en una sal metálica insoluble.

En la práctica, se prepara normalmente un lote grande de componente adsorbido en una sal metálica insoluble. A continuación se analiza una muestra de este lote mediante el procedimiento de la invención.

El procedimiento de la invención puede ilustrarse usando un ejemplo de una proteína como el componente adsorbido, y un primer y un segundo anticuerpos como el reactivo de unión. Como se ha indicado anteriormente, se puede llevar a cabo una etapa de bloqueo que comprende incubar el componente adsorbido en BSA. Esto asegura que se ocupen todos los sitios de unión no ocupados en la sal metálica insoluble, para evitar la adsorción de cualquier reactivo de unión en la sal metálica insoluble. A continuación, el componente absorbido se incuba con un primer reactivo, en este ejemplo, un anticuerpo, que se une a la proteína absorbida y no a cualesquiera otros componentes utilizados en el ensayo. Esta etapa va seguida de la adición de un segundo reactivo, que comprende una marca que puede detectar el citómetro de flujo, y que se une específicamente al primer reactivo, por ejemplo, un anticuerpo marcado fluorescentemente que se une al primer anticuerpo (por ejemplo, mediante unión a la región Fc del primer anticuerpo, de tal manera que el primer anticuerpo es un anticuerpo de cabra, el segundo anticuerpo debe ser un anticuerpo procedente de otra especie dirigido contra una Ig de cabra). Se incorporan etapas de lavado según sea necesario entre las etapas de unión.

El procedimiento de analizar un componente absorbido mediante citometría de flujo puede comprender una o más etapas adicionales antes de pasar el componente absorbido a través del citómetro de flujo. De esta manera, la invención proporciona un procedimiento de analizar un componente adsorbido que comprende una o más de las etapas de:

- sintetizar partículas de sales metálicas insolubles;
- suspender las partículas de sales metálicas insolubles en un líquido;
- sintetizar uno o más componentes para la adsorción;
- combinar partículas de sales metálicas insolubles con uno o más componentes para la adsorción;
- incubar una combinación de partículas de sales metálicas insolubles con uno o más componentes para la adsorción en condiciones que permitan la adsorción del componente sobre las partículas de sales metálicas insolubles;
- combinar la suspensión de componente adsorbido sobre una sal metálica insoluble con uno o más componentes adicionales, por ejemplo, componentes adsorbidos sobre una sal metálica insoluble que se puede haber

analizado opcionalmente ya mediante el procedimiento de citometría de flujo de la invención;

- dilución o concentración del uno o más componentes adsorbidos en la sal metálica insoluble;
- filtrar la suspensión de componente adsorbido sobre una sal metálica insoluble;
- 5 • intercambiar el disolvente en el que se suspenden las partículas, que puede ser el intercambio de un disolvente no acuoso en un disolvente acuoso (y viceversa) o el intercambio del componente tampón de un disolvente acuoso;
- tomar una muestra del lote de componente adsorbido;
- añadir un conservante a la suspensión del componente adsorbido sobre una sal metálica insoluble;
- añadir una sal fisiológica a la suspensión de componente adsorbido sobre una sal metálica insoluble;
- 10 • alterar el pH de la suspensión de componente adsorbido sobre una sal metálica insoluble;
- alterar la osmolalidad de la suspensión de componente adsorbido sobre una sal metálica insoluble;
- esterilizar la suspensión de componente adsorbido sobre una sal metálica insoluble;
- eliminar la endotoxina de una suspensión de componente adsorbido sobre una sal metálica insoluble;
- añadir un reactivo de bloqueo; y/o
- 15 • añadir uno o más reactivos de unión;

y la etapa de analizar el componente adsorbido mediante citometría de flujo.

El orden de las etapas relacionadas anteriormente no es una indicación estricta del orden en el que se llevan a cabo en el procedimiento, pero proporciona un ejemplo en el que se pueden combinar. Está también comprendido entre las capacidades de las personas expertas, que siguen las enseñanzas del presente documento, generar
20 procedimientos adicionales de análisis mediante la redistribución y/o repetición de una o más etapas. Muchas de las etapas (por ejemplo, el muestreo, el ajuste del pH, la dilución o la concentración etc.) pueden llevarse a cabo más de una vez en diferentes fases.

La medición mediante citometría de flujo, sin embargo, proporciona datos solo del grado de adsorción del componente en la sal metálica insoluble en el momento del ensayo. En la práctica, las composiciones farmacéuticas
25 pueden mantenerse durante meses, y a menudo años, antes del uso. Es bien sabido que los componentes adsorbidos pueden llegar a desorberse de las sales metálicas insolubles con el tiempo, y esta desorción depende de la sal metálica insoluble concreta, el componente adsorbido y el tampón, *entre otros*. El procedimiento de la presente invención puede por tanto utilizarse repetidamente en el tiempo para evaluar muestras adicionales procedentes del mismo lote de componente adsorbido en una sal metálica insoluble para determinar la estabilidad de la interacción
30 de adsorción. Un intervalo de variables (composición tampón, temperatura, osmolalidad, etc.) se pueden ensayar para determinar las condiciones óptimas para el almacenamiento de una composición y determinar fácil y rápidamente el grado de adsorción utilizando el procedimiento de la invención. De esta manera, la invención proporciona un procedimiento para determinar la estabilidad de un componente adsorbido que comprende determinar el grado de adsorción de un componente en una sal metálica mediante citometría de flujo y repetir el
35 análisis de citometría de flujo una o más veces.

Como se ha indicado anteriormente, los resultados del análisis del componente adsorbido en la sal metálica insoluble pueden determinar si se realizan varias etapas posteriores. Las propiedades del componente adsorbido
40 analizado se comparan normalmente con parámetros predeterminados. Estos parámetros pueden variar ampliamente. Por ejemplo, para una composición concreta, pueden preferirse tamaños concretos de partículas de sales metálicas insolubles, pueden preferirse relaciones concretas de sal metálica insoluble al componente adsorbido o relaciones concretas de componentes adsorbidos si la composición evaluada comprende más de uno, o se requiere estabilidad durante un periodo de tiempo particular en condiciones específicas. Los parámetros concretos que deben cumplirse son, por supuesto, dependientes de la sal metálica insoluble, el componente adsorbido, el tampón, y el uso en última instancia del componente adsorbido.

El procedimiento de la invención tiene muchas aplicaciones. Por ejemplo, puede formar una etapa de control de calidad en un proceso de fabricación y distribución. Se divulga en el presente documento un procedimiento para fabricar una composición que comprende la etapa de analizar un componente adsorbido marcado mediante citometría de flujo y una o más de las etapas de:

- 50 • calcular uno o más parámetros de los datos adquiridos en el análisis de citometría de flujo, por ejemplo, la distribución del tamaño de partículas, el % de adsorción del componente en la sal metálica insoluble y/o la distribución del antígeno sobre las partículas metálicas;

- decidir proceder con la fabricación de una composición que incorpora el lote evaluado de componente adsorbido sobre la base de los resultados del análisis de citometría de flujo;
- combinar la suspensión de componente adsorbido sobre una sal metálica insoluble con uno o más componentes adicionales, por ejemplo, componentes adsorbidos sobre una sal metálica insoluble que se puede haber analizado también por el procedimiento de citometría de flujo de la invención;
- filtrar la suspensión de componente adsorbido sobre una sal metálica insoluble;
- intercambiar el disolvente en el que se suspenden las partículas, que puede ser el intercambio de un disolvente no acuoso en un disolvente acuoso (y viceversa) o el intercambio del componente tampón de un disolvente acuoso;
- añadir un conservante a la suspensión del componente adsorbido sobre una sal metálica insoluble;
- añadir una sal fisiológica a la suspensión de componente adsorbido sobre una sal metálica insoluble;
- alterar el pH de la suspensión de componente adsorbido sobre una sal metálica insoluble;
- alterar la osmolalidad de la suspensión de componente adsorbido sobre una sal metálica insoluble;
- esterilizar la suspensión de componente adsorbido sobre una sal metálica insoluble;
- eliminar la endotoxina de una suspensión de componente adsorbido sobre una sal metálica insoluble;
- liofilizar una suspensión de componente adsorbido sobre una sal metálica insoluble;
- resuspender un liofilizado de componente adsorbido sobre una sal metálica insoluble;
- dividir la suspensión de componente adsorbido sobre una sal metálica insoluble en volúmenes pequeños;
- preparar una dosis unitaria de la suspensión de componente adsorbido sobre una sal metálica insoluble;
- preparar una dosis unitaria de la suspensión de componente adsorbido sobre una sal metálica insoluble como un inyectable; y/o
- envasar una dosis unitaria de la suspensión de componente adsorbido sobre una sal metálica insoluble, opcionalmente con instrucciones para el uso.

El orden de las etapas relacionadas anteriormente no es una indicación del orden en el que se van a llevar a cabo en el procedimiento de fabricación. De hecho, muchas de las etapas (por ejemplo, el muestreo, el ajuste del pH, la dilución o la concentración etc.) pueden llevarse a cabo más de una vez en diferentes etapas en el procedimiento de fabricación. La etapa de analizar el componente adsorbido puede llevarse a cabo en casi cualquier etapa en el procedimiento, y proporciona una importante información en cada punto. De hecho, puede llevarse a cabo múltiples veces. Por ejemplo, un cambio en el tampón o el pH de la suspensión a uno adecuado para una composición para su uso como un producto farmacéutico puede interferir con la interacción de la adsorción, o puede hacer que las partículas de la sal metálica insoluble se agreguen en un mayor o menor grado. Al analizar una muestra de la suspensión que comprende el componente adsorbido antes y después de una etapa en el procedimiento, el efecto preciso de esta etapa puede determinarse simple y rápidamente. Tras su fabricación (que incluye la etapa de análisis mediante citometría de flujo), el componente adsorbido, se puede distribuir opcionalmente en la forma de una composición. Se divulga en el presente documento un procedimiento de distribuir un componente adsorbido, o una composición que comprende el componente adsorbido, que comprende un procedimiento de citometría de flujo o un procedimiento de fabricación como se muestra anteriormente y la etapa de distribuir el componente adsorbido o la composición que comprende el componente adsorbido.

La muestra

A continuación se analizará una muestra de este lote mediante el procedimiento de la invención. La muestra tiene normalmente menos de 100 ml, por ejemplo, menos de 50 ml, menos de 40 ml, menos de 30 ml, menos de 20 ml, menos de 10 ml, menos de 5 ml, menos de 4 ml, menos de 3 ml, menos de 2 ml, menos de 1 ml, o menos de 0,5 ml. La muestra tiene normalmente al menos 100 µl, por ejemplo, al menos 200 µl, al menos 300 µl, al menos 400 µl, al menos 500 µl, al menos 600 µl, al menos 700 µl, al menos 800 µl, al menos 900 µl, al menos 1 ml, al menos 2 ml, al menos 3 ml, al menos 4 ml, o al menos 5 ml. El lote de componente adsorbido de sal metálica insoluble puede tener una concentración diferente a la concentración de sal metálica insoluble y/o componente adsorbido que es adecuado para el análisis mediante el procedimiento de citometría de flujo de la invención. Por tanto, puede ser necesario diluir o concentrar la suspensión según sea necesario para conseguir la concentración deseada de sal metálica insoluble y/o de componente adsorbido. Normalmente, el análisis de citometría de flujo se lleva a cabo sobre suspensiones con una concentración de partículas de 10^3 - 10^9 partículas ml^{-1} , por ejemplo 10^4 - 10^8 partículas ml^{-1} , 10^5 - 10^7 partículas ml^{-1} tal como aproximadamente 10^6 partículas ml^{-1} . La concentración de sal metálica insoluble puede

variar desde aproximadamente $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ - aproximadamente 100 mg ml^{-1} , por ejemplo, aproximadamente $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ - aproximadamente 10 mg ml^{-1} , aproximadamente $500 \mu\text{g ml}^{-1}$ - aproximadamente 5 mg ml^{-1} , tal como aproximadamente 1000 a aproximadamente $2000 \mu\text{g ml}^{-1}$. De forma similar, la concentración de componente adsorbido puede variar, pero será aproximadamente de $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ - aproximadamente 10 mg ml^{-1} , por ejemplo, aproximadamente $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ - aproximadamente 1 mg ml^{-1} , aproximadamente $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ - aproximadamente $500 \mu\text{g ml}^{-1}$, tal como aproximadamente $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ a aproximadamente $150 \mu\text{g ml}^{-1}$

Determinación de la adsorción

El componente adsorbido se detecta a través de una marca específica. Esta marca puede ser parte del componente adsorbido, por ejemplo, una porción de una molécula pequeña que contiene una región de enlaces conjugados, como se detalla adicionalmente a continuación. En una alternativa, la marca puede unirse al componente adsorbido a través de un reactivo de unión. Los reactivos y marcas de unión para su uso en el procedimiento de la invención se describen con más detalle a continuación.

Cuando el componente se adsorbe en la sal metálica insoluble, la partícula de la sal metálica insoluble puede a continuación detectarse en el componente adsorbido, tanto mediante la marca intrínseca como mediante uno o más reactivos de unión utilizados para unirse a la marca. De esta manera, una partícula de sal metálica insoluble que tiene uno o más componentes adsorbidos puede distinguirse de una partícula de sal metálica insoluble que no tiene componentes unidos a ella. De esta manera, el presente procedimiento permite la determinación de la distribución del antígeno sobre la suspensión de sal metálica insoluble.

La determinación de la distribución de la adsorción es importante para asegurar que se ha alcanzado la relación óptima del componente y el adyuvante, por ejemplo, para asegurar la adsorción completa con la pérdida mínima de antígeno en exceso, o para asegurar la respuesta máxima *in vivo*.

Análisis de las suspensiones que contienen múltiples componentes adsorbidos

El procedimiento de la invención puede utilizarse para analizar específicamente un único antígeno en una suspensión de múltiples componentes adsorbidos. El procedimiento puede utilizarse también para analizar múltiples especies de componente adsorbido en una suspensión. La suspensión puede contener partículas de sales metálicas insolubles con múltiples componentes adsorbidos diferentes. Esta suspensión puede generarse mediante la adición de una solución que contiene las diferentes especies de componentes para la adsorción de la suspensión de sal metálica insoluble. En una alternativa, la suspensión de múltiples componentes adsorbidos puede comprender partículas de sales metálicas insolubles cada una de las cuales tiene solo especies de componentes adsorbidos por esta. Esta suspensión puede generarse adsorbiendo cada componente en la sal metálica insoluble en aislamiento antes de combinarlos.

En esencia, el procedimiento para analizar múltiples componentes adsorbidos comprende el comportamiento del procedimiento de la invención múltiples veces en paralelo. Tras la etapa de bloqueo opcional, si es necesario, se añaden múltiples reactivos de unión, de forma simultánea o en serie, siendo cada reactivo de unión específico en su unión con un componente adsorbido diferente. El resultado de la adición de los reactivos de unión es la unión de una marca detectable diferente a cada componente adsorbido diferente, permitiendo de esta manera la detección de cada componente adsorbido en aislamiento de los componentes restantes de la suspensión. En una alternativa, un reactivo de unión puede unirse a todos los componentes adsorbidos. Esta alternativa permitiría la detección de la cantidad total de adsorción por el componente adsorbido diferente en la sal metálica insoluble.

En una realización, las múltiples especies de componente adsorbido se adsorben en la misma sal metálica (por ejemplo, hidróxido de aluminio). En otra realización, las especies se adsorben en diferentes sales metálicas, por ejemplo, en una suspensión que comprende dos componentes adsorbidos, el primer componente se adsorbe en hidróxido de aluminio y el segundo componente se adsorbe en fosfato de aluminio.

Reactivos de unión

Los procedimientos de la invención requieren normalmente el uso de un reactivo de unión que se utiliza para marcar el componente adsorbido. El reactivo de unión puede ser un único reactivo, o puede comprender dos o más reactivos. Si el reactivo de unión comprende más de un reactivo, estos reactivos pueden añadirse de forma simultánea o secuencial. Si se usa un reactivo de unión, el primer reactivo es un compuesto que se une al componente adsorbido, usualmente, de forma específica a este componente adsorbido. Si el compuesto adsorbido es una proteína o un hidrato de carbono, el primer reactivo puede ser un anticuerpo que se une al componente. Si el componente adsorbido es un receptor, el primer reactivo puede ser un ligando que se une a este receptor (o viceversa). Si el compuesto adsorbido es un hidrato de carbono, el primer reactivo puede ser una lectina.

La unión de un reactivo al componente adsorbido puede indicar en algunos casos que el componente está en una forma biológicamente activa. Si se sabe que una conformación concreta del componente es necesaria para la actividad biológica del componente, a continuación, utilizando un anticuerpo que se une solo a un epítipo presente en la forma activa, la forma activa puede marcarse específicamente y de esta manera detectarse. De forma análoga, si el componente es un ligando, y este puede unirse a su receptor específico, entonces esto puede ser una

indicación de que el componente adsorbido es una configuración biológicamente activa.

El primer reactivo puede unirse a una marca que es detectable por el citómetro de flujo, en cuyo caso, el primer reactivo será normalmente el único reactivo. En una alternativa, el primer reactivo puede unirse a una marca que no es detectable por el citómetro de flujo, es decir, una etiqueta, por ejemplo, una asociada a un emparejamiento de afinidad típico (por ejemplo, biotina y avidina), o una secuencia de la etiqueta tal como His₆, la etiqueta *myc* o FLAG. En una alternativa adicional, el primer reactivo no está marcado. Normalmente, si el primer reactivo comprende una marca detectable, entonces no se requiere un segundo reactivo. Si el primer reactivo se une a una marca no detectable o no se marca, entonces no se emplea normalmente un segundo reactivo.

El segundo reactivo comprende normalmente una marca que es detectable por el citómetro de flujo. El segundo reactivo es capaz de unirse al primer reactivo. El segundo reactivo es a menudo un anticuerpo con afinidad por el primer reactivo. En el caso donde el primer reactivo es un anticuerpo, el segundo reactivo es normalmente un anticuerpo que se une al primer anticuerpo (es decir, si el primer reactivo era un anticuerpo de cabra, el segundo reactivo debe ser un anticuerpo dirigido contra el anticuerpo de cabra). Como se ha detallado anteriormente, en algunos casos, el primer reactivo comprende una marca que no es detectable por el citómetro de flujo. En esta situación, el segundo reactivo puede unirse específicamente a la marca del primer reactivo, por ejemplo, si la marca no detectable en el primer reactivo es una etiqueta FLAG, el segundo reactivo es idealmente un anticuerpo dirigido contra FLAG.

Si el reactivo de unión es un anticuerpo, puede ser un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal. Se prefiere utilizar un anticuerpo monoclonal donde se desea la unión a un epítipo específico, por ejemplo, en la situación donde específicamente se está marcando una forma activa de un componente adsorbido. Los anticuerpos de la invención pueden ser de cualquier isotipo (por ejemplo, IgA, IgG, IgM, es decir, una cadena pesada α , γ o μ) y puede tener una cadena ligera κ o una λ . El anticuerpo puede derivarse de una variedad de fuentes, por ejemplo, ser humano, vaca, rata, ratón, cerdo, cabra, conejo, camello, oveja, cobaya, serpiente, rana, llama, carpa, tiburón, perro, gato, pato, avestruz o pollo.

Aunque normalmente, un reactivo de unión que comprende más de un reactivo se compondrá de dos reactivos, no existe límite superior al número de reactivos. Todo lo que se requiere es que cada reactivo del reactivo de unión se una al reactivo anterior, y en última instancia introducir una marca que se une específicamente al componente adsorbido. De esta manera, el reactivo de unión puede comprender uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más de diez reactivos.

Marcas para la detección mediante el citómetro de flujo

Si el componente adsorbido no es intrínsecamente fluorescente (es decir, no autofluoresce) entonces, como se ha detallado anteriormente, es necesario utilizar uno o más reactivos de unión que comprendan una marca que se pueda detectar por el citómetro de flujo. Normalmente esta será una marca luminiscente, por ejemplo, una marca fluorescente. Existe una amplia gama de marcas fluorescentes que son compatibles con el procedimiento de la invención. La selección de una marca adecuada es dependiente de cualquier absorción intrínseca y de los espectros de emisión de la sal metálica insoluble, del(de los) componente(s) adsorbido(s), y cualesquiera otros reactivos utilizados en el ensayo. La fluorescencia intrínseca de los componentes puede determinarse simplemente pasando los componentes de la prueba a través del citómetro de flujo sin la marca detectable, tal como se describe en el presente documento.

Las marcas deben seleccionarse con espectros de absorción y emisión que no interfieran, o no interfieran en una extensión significativa, con aquellos de los compuestos de la prueba. Los espectros no interfieren en un grado significativo si el componente absorbente marcado puede detectarse de forma específica y sensible cuando pasa a través del citómetro de flujo.

Están disponibles una amplia gama de marcas que abarcan el espectro de luz visible (véase la Tabla 1 para una lista no limitante de marcas fluorescentes). En la referencia 5 se pueden encontrar marcas adicionales y una guía para el marcado fluorescente. La selección de una marca o combinación de marcas adecuadas está también comprendida en las capacidades de las personas expertas que siguen las enseñanzas del presente documento.

Detección sin reactivos de unión

Como se ha indicado anteriormente, algunos compuestos adsorbidos pueden fluorescer intrínsecamente, un fenómeno denominado también autofluorescencia. Cuando dicho compuesto se adsorbe en una sal metálica insoluble, no se requiere el uso de uno o más reactivos de unión para marcar el componente adsorbido para permitir la detección del complejo adsorbido mediante citometría de flujo. En su lugar, se puede llevar a cabo el análisis de citometría de flujo inmediatamente después de la adsorción. Opcionalmente, se pueden emplear una o más etapas de lavado para eliminar el componente adsorbido no unido de las partículas de la sal metálica insoluble. Los componentes adsorbidos intrínsecamente fluorescentes contienen normalmente sistemas conjugados, es decir, un sistema de orbitales p conectados en una serie de enlaces simples y dobles alternantes, que permite la deslocalización de los electrones π . El sistema conjugado puede ser aromático, no aromático o antiaromático.

Una clase ilustrativa de moléculas autofluorescentes comprende una estructura de benzonafiridina, por ejemplo, los SMIP que son análogos del Compuesto A. En la Tabla 2 se presentan numerosos análogos del Compuesto A, incluyendo los compuestos B a H. Cualesquiera de los compuestos generales y específicos de las referencias 6 puede analizarse utilizando la invención, al igual que otras moléculas autofluorescentes (en particular SMIP) que comprenden un grupo fosfonato (o un grupo fosfinato, un grupo fosfonito, un grupo fosfinito, o un grupo fosfato) y que se pueden adsorber en sales metálicas insolubles.

El componente adsorbido autofluorescente puede ser una proteína. La fluorescencia mediante una proteína puede ser el resultado de la fluorescencia intrínseca de los restos de triptófano en esta proteína, aunque los restos de tirosina y fenilalanina pueden realizar una contribución menor a la fluorescencia. Los tres restos tienen distinta absorción y máxima emisión, que son normalmente como sigue: el triptófano absorbe a 280 nm y fluoresce a 348 nm, la tirosina absorbe a 274 nm y fluoresce a 303 nm y la fenilalanina absorbe a 257 nm y fluoresce a 282 nm. La absorción exacta y las longitudes de onda de fluorescencia del resto dependen del entorno químico local del resto. Los restos de triptófano que son regiones hidrófobas de unas proteínas, por ejemplo, del núcleo, pueden tener espectros que se desplazan en 10 a 20 nm en comparación con un triptófano en las regiones hidrófilas, por ejemplo, la superficie, de la proteína.

Si el componente es una proteína que se asocia con un cofactor, entonces, la fluorescencia de este cofactor se puede utilizar como una marca para detectar el componente. NADH y/o NADPH son cofactores de numerosas proteínas, y tienen una absorción aproximada y una fluorescencia máxima a 340 nm y 460 nm respectivamente. Riboflavina, FMN y FAD absorben a aproximadamente 450 nm y fluorescen a aproximadamente 525 nm. Otros cofactores se basan en un anillo de porfirina. Las proteínas que comprenden un anillo de porfirina incluyen proteínas que contienen hemo y proteínas que contienen clorofila.

Algunos componentes pueden comprender fluoróforos intrínsecos que no son cofactores. Por ejemplo, la proteína fluorescente verde (GFP) y sus derivados comprenden un anillo fluoróforo heterocíclico de imidazolin-5-ona formado a partir del tripéptido Thr-Tyr-Gly presente en la secuencia primaria de la proteína.

En algunas realizaciones, la invención abarca procedimientos en que existen múltiples componentes adsorbidos, al menos uno de los cuales es autofluorescente y al menos uno de los cuales se marca utilizando un reactivo de unión, por ejemplo, una realización en la que un antígeno y un compuesto de la Tabla 2 se adsorben en una sal metálica.

Bloqueo

En algunas suspensiones que se analizan mediante el procedimiento de la invención, se contempla que algunos de los sitios capaces de unir componentes sobre la sal metálica insoluble no estén ocupados por el componente adsorbido. En este caso, se puede llevar a cabo una etapa adicional para bloquear los sitios libres antes de la adición de un reactivo de unión. Por bloqueo se entiende la adición de un reactivo adicional que es capaz de adsorción en la sal metálica insoluble, pero que difiere del componente adsorbido y que no se reconoce por un reactivo de unión. Esto asegura que el riesgo de que los sitios de unión que permanecen en la sal metálica insoluble tras la adsorción del componente adsorbido estén ocupados por el reactivo de unión se minimice o elimine. La unión no específica, es decir, la adsorción, del reactivo de unión a la sal metálica insoluble debe evitarse ya que puede conducir a una reducción en la sensibilidad y la especificidad del procedimiento. Los reactivos típicos utilizados para bloquear los sitios de unión en la sal metálica insoluble incluyen uno o más de BSA, suero de ternero recién nacido, caseína, digerido de caseína, leche en polvo (por ejemplo, leche en polvo desnatada), albúmina de pollito, suero de conejo, suero de caballo, suero de cabra, suero de ratón, suero humano, suero de rata, suero de cerdo, Block Ace (Serotec), Extracto de *E. coli*, gelatina de piel de cerdo, gelatina de piel de pescado, suero de salmón arcoiris, tampón de bloqueo exento de proteína (Pierce), ADN de esperma de salmón y ADN genómico cortado aleatoriamente. De esta manera, la invención proporciona un procedimiento adicional que comprende la etapa de bloquear la sal metálica insoluble, antes de la adición del reactivo de unión.

Lavado

Usualmente, la etapa de lavado comprende centrifugar las partículas de la sal metálica insoluble para formar un aglomerado, aspirar el sobrenadante y sustituir este con una solución de tampón reciente. A continuación se pasa la suspensión a través del citómetro de flujo, que es capaz de detectar el tamaño de la partícula (proporcionando de esta manera información sobre el número de partículas de sales metálicas insolubles en el intervalo de tamaño deseado y excluyendo también cualesquiera agregados del reactivo de unión procedentes del análisis) y también cualquier luminiscencia procedente de la marca unida al componente adsorbido (que permite la diferenciación entre partículas de sales metálicas insolubles que tienen el componente adsorbido a las anteriores, y aquellas que no lo tienen, y también el grado de adsorción). De esta manera, se puede determinar la proporción de las partículas en la suspensión que tienen un tamaño adecuado y que fluorescen también adecuadamente (indicando la presencia del componente adsorbido). Esta información puede a continuación utilizarse para determinar si el lote de material que se ha evaluado es adecuado o no para los procesos posteriores.

Sales metálicas insolubles

Tal como se desvela en el presente documento, los componentes pueden adsorberse en sales metálicas insolubles,

formando por tanto un complejo adsorbido. Por ejemplo, puede adsorberse en sales de calcio insolubles (por ejemplo, fosfato de calcio) o, preferentemente, en sales de aluminio insolubles. Dichas sales de aluminio tienen un largo historial de uso en vacunas. Las sales de aluminio que incluyen iones hidróxido son las sales metálicas insolubles preferidas para su uso con la presente invención.

- 5 Las sales de aluminio útiles incluyen, aunque no de forma limitativa, hidróxido de aluminio, oxihidróxido de aluminio, e hidroxifosfatos de aluminio (incluyendo hidroxifosfato sulfato de aluminio). Dichas sales se describen, por ejemplo, en los capítulos 8 y 9 de la referencia 7.

Las sales preferidas para la adsorción de componentes son los oxihidróxidos de aluminio y/o el hidroxifosfato de aluminio. Estas tienen restos hidroxilo superficiales que pueden experimentar fácilmente el intercambio del ligando con grupos que contienen fósforo (por ejemplo, fosfatos, fosfonatos) para proporcionar una adsorción estable.

- 10 Los adyuvantes comúnmente conocidos como "hidróxido de aluminio" son típicamente sales de oxihidróxido de aluminio, que normalmente son al menos parcialmente cristalinas. El oxihidróxido de aluminio, que puede representarse por la fórmula $\text{AlO}(\text{OH})$, puede distinguirse de otros compuestos de aluminio, tales como hidróxido de aluminio $\text{Al}(\text{OH})_3$, mediante espectroscopía infrarroja (IR), en particular, por la presencia de una banda de absorción a 1070cm^{-1} y un hombro intenso a $3090\text{-}3100\text{cm}^{-1}$ (capítulo 9 de la ref. 7). El grado de cristalinidad de un adyuvante de hidróxido de aluminio se refleja por el ancho de la banda de difracción a media altura (WHH), mostrando las partículas poco cristalinas un mayor ensanchamiento de la línea debido a los tamaños cristalinos menores. El área superficial aumenta a medida que aumenta WHH, y se ha observado que los adyuvantes con mayores valores de WHH tienen mayor capacidad de adsorción de antígeno. Una morfología fibrosa (por ejemplo, tal como se observa en micrografías electrónicas de transmisión) es típica de los adyuvantes de hidróxido de aluminio. La pl de los adyuvantes de hidróxido de aluminio es normalmente de aproximadamente 11, es decir, el propio adyuvante tiene una carga superficial positiva a pH fisiológico. Se han comunicado capacidades de adsorción de entre 1,8-2,6 mg de proteína por mg de Al^{+++} a pH 7,4 para adyuvantes de hidróxido de aluminio.

- 25 Los adyuvantes conocidos como "fosfato de aluminio" son típicamente sales de hidroxifosfatos de aluminio, que a menudo contienen también una pequeña cantidad de sulfato (es decir, hidroxifosfato sulfato de aluminio). Se pueden obtener mediante precipitación, y las condiciones de reacción y las concentraciones durante la precipitación influyen en el grado de sustitución de fosfato por hidroxilo en la sal. Los hidroxifosfatos tienen generalmente una relación molar PO_4/Al entre 0,3 y 1,2. Los hidroxifosfatos pueden distinguirse de AlPO_4 estrictos por la presencia de grupos hidroxilo. Por ejemplo, una banda de espectro IR a 3164cm^{-1} (por ejemplo, cuando se calienta a 200°C) indica la presencia de hidroxilos estructurales (capítulo 9 de la referencia 7).

- 30 La relación molar de $\text{PO}_4/\text{Al}^{3+}$ de un adyuvante de fosfato de aluminio será generalmente entre 0,3 y 1,2, preferentemente entre 0,8 y 1,2, y más preferentemente $0,95\pm 0,1$. El fosfato de aluminio será generalmente amorfo, particularmente para sales de hidroxifosfato. Un adyuvante típico es hidroxifosfato de aluminio amorfo con una relación molar de PO_4/Al entre 0,84 y 0,92, incluida a 0,6 mg Al^{3+}/ml . El fosfato de aluminio será generalmente particulado (por ejemplo, morfología similar a placas como se observa en micrografías electrónicas de transmisión). Los diámetros típicos de las partículas están en el intervalo de 0,5-20 μm (por ejemplo, aproximadamente 5-10 μm) después de cualquier adsorción del antígeno. Se han comunicado capacidades de adsorción de entre 0,7-1,5 mg de proteína por mg de Al^{+++} a pH 7,4 para adyuvantes de fosfato de aluminio.

- 40 El punto de carga cero (PZC) del fosfato de aluminio está inversamente relacionado con el grado de sustitución del fosfato por hidroxilo, y este grado de sustitución puede variar dependiendo de las condiciones de reacción utilizadas para preparar la sal mediante precipitación. El PZC también se altera cambiando la concentración de iones fosfato libres en solución (más fosfato = más PZC ácido) o añadiendo un tampón, tal como un tampón de histidina (hace que el PZC sea más básico). Los fosfatos de aluminio usados de acuerdo con la invención tendrán un PZC de entre 4,0 y 7,0, más preferentemente entre 5,0 y 6,5 por ejemplo, aproximadamente 5,7.

- 45 Una composición que incluye un componente adsorbido en una sal metálica insoluble puede incluir también un tampón (por ejemplo, un fosfato o una histidina o un tampón Tris).

- Debido a la insolubilidad de las sales metálicas adsorbtivas que son útiles en la invención, las composiciones que contienen componentes adsorbidos serán generalmente suspensiones que tienen una apariencia turbia. Esto puede enmascarar la contaminación por crecimiento bacteriano y de esta manera, el procedimiento de fabricar una composición a partir de un lote de un componente adsorbido (que se ha evaluado mediante citometría de flujo) puede incluir la etapa de añadir un conservante tal como tiomersal o 2-fenoxietanol. Se prefiere que la composición deba estar sustancialmente exenta de (por ejemplo $<10\text{ }\mu\text{g/ml}$) material mercurial, por ejemplo, exenta de tiomersal. Son más preferidos los procedimientos de fabricación de una composición que no contiene mercurio. De esta manera, un procedimiento divulgado en el presente documento puede comprender la etapa de eliminar el material mercurial de una suspensión de componente absorbido.

La composición puede incluir una mezcla de oxihidróxido de aluminio y un hidroxifosfato de aluminio, y los componentes adsorbidos pueden adsorberse en una o ambas sales.

La concentración de Al^{+++} en una composición para su administración a un paciente es preferentemente menor de 10

mg/ml, por ejemplo, ≤ 5 mg/ml, ≤ 4 mg/ml, ≤ 3 mg/ml, ≤ 2 mg/ml, ≤ 1 mg/ml, etc. Un intervalo preferido es entre 0,3 y 1 mg/ml. Se prefiere un máximo de $< 0,85$ mg/dosis. La concentración de Al⁺⁺⁺ en la composición farmacéutica puede diferir de la concentración en suspensión analizada mediante el procedimiento de citometría de flujo de la invención.

Inmunógenos

- 5 La invención es particularmente útil para evaluar los componentes adsorbidos en, o para la incorporación en, composiciones inmunógenas. Los componentes adsorbidos evaluados mediante el procedimiento de la invención pueden ser útiles durante la inmunización.

10 La invención puede utilizarse con una amplia gama de componentes adsorbidos que se pueden utilizar para tratar o proteger contra un amplio intervalo de enfermedades. El componente adsorbido puede estimular una respuesta inmunitaria que proteja frente a una enfermedad vírica (por ejemplo, debido a un virus con envoltura o sin envoltura), una enfermedad bacteriana (debida, por ejemplo, a una bacteria Gram negativa o una bacteria Gram positiva), una enfermedad fúngica, una enfermedad parasítica, una enfermedad autoinmunitaria, o cualquier otra enfermedad. El componente adsorbido puede ser también útil en inmunoterapia, por ejemplo, para el tratamiento de un tumor/cáncer, la enfermedad de Alzheimer, o una adicción.

15 El componente adsorbido puede tomar diversas formas, por ejemplo, un organismo completo, una vesícula con membrana externa, un polipéptido, un sacárido, un liposacárido, un conjugado (por ejemplo, de un transportador y un hapteno, o de un transportador y un sacárido o liposacárido), etc. Cuando el componente adsorbido es un polipéptido, será normalmente un polipéptido superficial, por ejemplo, una adhesina, una hemaglutinina, una glucoproteína de la envoltura, una glucoproteína de la espiga, etc.

20 El componente adsorbido puede estimular una respuesta inmunitaria contra el virus de la gripe, incluyendo los virus de la gripe A y B. Están actualmente disponibles diversas formas de inmunógeno de virus de la gripe, basadas normalmente tanto en el virus vivo como en el virus inactivado. Las vacunas inactivadas pueden estar basadas en viriones completos, viriones divididos, o en antígenos superficiales purificados.

25 Los antígenos de la gripe pueden presentarse también en la forma de virosomas. La hemaglutinina es el principal componente adsorbido en las vacunas inactivadas actuales, y las dosis de vacunas se normalizan por referencia a los niveles HA, medidos normalmente mediante SRID. Las vacunas existentes contienen normalmente aproximadamente 15 μ g de HA por cepa, aunque se pueden utilizar dosis más bajas, por ejemplo, para niños, o en situaciones pandémicas, o cuando se utiliza un adyuvante. Se han utilizado dosis fraccionadas tales como $\frac{1}{2}$ (es decir, 7,5 μ g de HA por cepa), $\frac{1}{4}$ y $\frac{1}{8}$, que tienen dosis mayores (por ejemplo, dosis de 3x o 9x [8,9]). De esta manera, las composiciones pueden incluir entre 0,1 y 150 μ g de HA por cepa de gripe, preferentemente entre 0,1 y 50 μ g, por ejemplo, 0,1-20 μ g, 0,1-15 μ g, 0,1-10 μ g, 0,1-7,5 μ g, 0,5-5 μ g, etc. Las dosis concretas incluyen, por ejemplo, aproximadamente 45, aproximadamente 30, aproximadamente 15, aproximadamente 10, aproximadamente 7,5, aproximadamente 5, aproximadamente 3,8, aproximadamente 3,75, aproximadamente 1,9, aproximadamente 1,5, etc., por cepa. Es normal incluir sustancialmente la misma masa de HA por cada cepa incluida en la vacuna, por ejemplo, de tal manera que la masa de HA por cada cepa está comprendida en el 10% de la masa de HA media por cepa, y preferentemente en el 5% de la media. Para vacunas vivas, la dosificación se mide por la mediana de la dosis de infección de cultivo de tejidos (TCID₅₀) en lugar de por el contenido de HA, y es normal una TCID₅₀ de entre 10^6 y 10^8 (preferentemente entre $10^{6.5}$ - $10^{7.5}$) por cepa. En lugar de usar huevos SPF como sustrato para el crecimiento vírico, cuando el virus se recoge de fluidos alantoicos infectados de gallinas, se pueden usar líneas de células que soporten la replicación del virus de la gripe. La línea de células será normalmente de origen mamífero, por ejemplo, MDCK. Los componentes adsorbidos del virus de la gripe A pueden ser de cualquier cepa del subtipo HA adecuada, por ejemplo, H1, H3, H5, H7, H9, etc., tal como la cepa H1N1, H3N2 y/o H5N1.

35 El componente adsorbido puede estimular una respuesta inmunitaria contra el hongo *Candida* tal como *C. albicans*. Por ejemplo, El componente adsorbido puede ser un β -glucano, que puede conjugarse a una proteína transportadora. el glucano puede incluir enlaces β -1,3 y/o β -1,6. Los componentes adsorbidos adecuados incluyen aquellos divulgados en las referencias 10 y 11.

45 El componente adsorbido puede estimular una respuesta inmunitaria contra la bacteria *Streptococcus*, incluyendo *S. agalactiae*, *S. pneumoniae* y *S. pyogenes*. Por ejemplo, el componente adsorbido puede ser un sacárido capsular, que puede conjugarse a una proteína transportadora. Para *S. agalactiae*, el sacárido puede ser de uno o más de los serotipos Ia, Ib, II, III, y/o V. Para *S. pneumoniae* el sacárido puede ser de uno o más de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F, y/o 23F. Además de (o en lugar de) inmunógeno(s) de sacáridos capsulares, los componentes adsorbidos del polipéptido se pueden usar para estimular una respuesta inmunitaria anti-estreptocócica protectora que comprende, por ejemplo, RrgB, como se divulga en la referencia 12.

55 El componente adsorbido puede estimular una respuesta inmunitaria contra la bacteria *Staphylococcus*, incluyendo *S. aureus* o *S. epidermidis*. Por ejemplo, el inmunógeno puede comprender un antígeno IsdA, un antígeno IsdB, un antígeno ClfA, un antígeno ClfB, un antígeno SdrD, un antígeno Spa, un antígeno EsxA, un antígeno EsxB, un antígeno Sta006, una hemolisina, y/o un antígeno Sta011. en la referencia 13 se divulgan los inmunógenos de *S. aureus* adecuados y sus combinaciones.

- El componente adsorbido puede estimular una respuesta inmunitaria contra una bacteria *meningocócica* (*Neisseria meningitidis*). Por ejemplo, el componente adsorbido puede ser un sacárido capsular, que puede conjugarse a una proteína transportadora. Los sacáridos capsulares son particularmente útiles para proteger frente a los meningococos de los serogrupos A, C, W135 y/o Y. Además del (o en lugar del) uno o más componentes adsorbidos de sacáridos capsulares, se pueden utilizar componentes adsorbidos polipeptídicos y/u otras vesículas de membranas externas para estimular una respuesta inmunitaria anti-meningocócica protectora, particularmente para el uso contra el serogrupo B, por ejemplo, como se divulga en la referencia 14.
- El componente adsorbido puede estimular una respuesta inmunitaria contra el virus de la hepatitis, tal como el virus de la hepatitis A, el virus de la hepatitis B, el virus de la hepatitis C y/o el virus de la hepatitis E. Por ejemplo, el componente adsorbido puede ser el antígeno superficial del virus de la hepatitis B (HBsAg).
- El componente adsorbido puede estimular una respuesta inmunitaria contra el virus sincitial respiratorio. Los componentes adsorbidos pueden ser de un grupo A del VSR y/o de un grupo B del VSR. Los inmunógenos adecuados pueden comprender las glucoproteínas F y/o G fragmentos de los mismos, por ejemplo, como se divulga en las referencias 15 y 16.
- El componente adsorbido puede estimular una respuesta inmunitaria contra la bacteria *Chlamydia*, incluyendo *C. trachomatis* y *C. pneumoniae*. Los componentes adsorbidos adecuados incluyen aquellos divulgados en las referencias 17-23.
- El componente adsorbido puede estimular una respuesta inmunitaria contra la bacteria *Escherichia coli*, incluyendo las cepas patógenas extraintestinales. Los componentes adsorbidos adecuados incluyen aquellos divulgados en las referencias 24-26.
- El componente adsorbido puede estimular una respuesta inmunitaria contra un coronavirus, tal como el coronavirus SARS humano. Los componentes adsorbidos pueden comprender la glucoproteína de la espiga.
- El componente adsorbido puede estimular una respuesta inmunitaria contra la bacteria *Helicobacter pylori*. Los componentes adsorbidos adecuados incluyen CagA [27-30], VacA [31,32], y/o NAP [33-35].
- El componente adsorbido puede estimular una respuesta inmunitaria contra el virus de la rabia. Un componente adsorbido adecuado es un virus de la rabia inactivado [36, RabAvert™].
- El componente adsorbido puede estimular una respuesta inmunitaria contra el virus del papiloma humano. Inmunógenos útiles son las proteínas de la cápsida L1, que se ensambla para formar estructuras conocidas como partículas de tipo virus (VLP). Las VLP pueden producirse mediante la expresión recombinante de L1 en células de levadura (por ejemplo, en *S. cerevisiae*) o en células de insecto (por ejemplo, en células de *Spodoptera*, tales como *S. frugiperda*, o en células de *Drosophila*). Para células de levadura, los vectores plásmidos pueden transportar el(los) gen(es) L1; para células de insecto, los vectores de baculovirus pueden transportar el(los) gen(es) L1. Más preferentemente, la composición incluye L1 de VLP de las cepas VPH-16 y VPH-18. Esta combinación bivalente ha mostrado ser muy eficaz [37]. Además de las cepas VPH-16 y VPH-18, es también posible incluir L1 de VLP de las cepas VPH-6 y VPH-11.
- El componente adsorbido puede estimular una respuesta inmunitaria contra un antígeno tumoral, tal como MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3 (MAGE-A3), MART-1/Melan A, tirosinasa, gp100, TRP-2, etc. El componente adsorbido puede estimular una respuesta inmunitaria contra el cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de mama, cáncer de próstata, etc.
- El componente adsorbido puede estimular una respuesta inmunitaria contra un hapteno conjugado con una proteína transportadora, donde el hapteno es una droga adictiva [38]. Los ejemplos incluyen, aunque no de forma limitativa, opiáceos, marihuana, anfetaminas, cocaína, barbitúricos, glutetimida, metiprilón, hidrato de cloral, metacualona, benzodiacepinas, LSD, nicotina, fármacos anticolinérgicos, fármacos antipsicóticos, triptamina, otros fármacos psicomiméticos, sedantes, fenciclidina, psilocibina, nitritos volátiles, y otros fármacos que induce dependencia física y/o psicológica.

Se pueden usar otros diversos componentes adsorbidos.

Composiciones para la inmunización contra *Neisseria meningitidis*

- El procedimiento de análisis de la invención es particularmente útil para evaluar componentes adsorbidos en composiciones inmunógenas para inmunizar contra meningococos, por ejemplo, contra el serogrupo B.
- Las composiciones inmunógenas preferidas preparadas mediante el procedimiento de fabricación divulgado en el presente documento comprenden: (i) un adyuvante de hidróxido de aluminio; (ii) compuesto 1, 2 o 5 en el presente documento; (iii) un primer polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 1; (iv) un segundo polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 2; y (v) un tercer polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 3, 4 o 5; en el que el compuesto de (ii) se adsorbe en el hidróxido de aluminio.

Los polipéptidos utilizados con la invención pueden, compararse con las SEQ ID NO en el presente documento, incluyen una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, etc.) de sustituciones de aminoácidos, tales como sustituciones conservativas (es decir, sustituciones de un aminoácido con otro que tiene una cadena secundaria relacionada). Los aminoácidos codificados genéticamente generalmente se dividen en cuatro familias: (1) ácidos, es decir, aspartato, glutamato; (2) básicos, es decir, lisina, arginina, histidina; (3) no polar, es decir, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polar sin cargar, es decir, glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. Fenilalanina, el triptófano y la tirosina a veces se clasifican juntos como aminoácidos aromáticos. En general, la sustitución de aminoácidos simples en estas familias no tienen un mayor efecto sobre la actividad biológica. Los polipéptidos pueden incluir también uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, etc.) deleciones de aminoácidos simples con respecto a las secuencias SEQ ID NO. Los polipéptidos pueden incluir también uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, etc.) inserciones (por ejemplo cada una de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos) con respecto a las secuencias SEQ ID NO.

Idealmente, 1, 2 o 3 del primer, segundo y/o tercer polipéptidos se adsorbe(n) también en el hidróxido de aluminio. Estos polipéptidos se divulgan con más detalle en las referencias 14 y 39. La composición producida mediante el procedimiento de fabricación puede incluir 5-100 µg de cada polipéptido. La composición idealmente no incluye ninguna vesícula de membrana externa bacteriana.

La composición producida mediante el procedimiento de fabricación puede incluir entre 5-100 µg del compuesto 1, 2 o 5. Por ejemplo, puede incluir entre 5-100 µg del compuesto 2 o puede incluir entre 5-100 µg del compuesto 5.

La composición puede incluir un tampón histidina, por ejemplo, un tampón histidina 10 mM. Puede incluir sacarosa y/o cloruro de sodio. Puede administrarse en un volumen de dosificación de 0,5 ml, por ejemplo, para inyección intramuscular.

Agonistas

El componente adsorbido para análisis mediante el procedimiento de la invención puede ser un agonista de un receptor. El componente adsorbido puede ser el ligando análogo del receptor que se produce naturalmente. En una alternativa, el agonista adsorbido puede ser un ligando del receptor que no se produce naturalmente. En alternativas adicionales, el agonista adsorbido puede ser un péptido mimético del receptor o una molécula pequeña capaz de unirse al receptor. Un ejemplo de una molécula pequeña capaz de unirse al receptor es un SMIP (un inmunopotenciador de molécula pequeña).

Por ejemplo, el componente adsorbido puede ser un agonista de TLR que comprende un resto de adsorción y un resto agonista de TLR. el resto de adsorción confiere la capacidad de adsorberse en una sal metálica insoluble (véase anteriormente), mientras que el resto agonista de TLR confiere la capacidad de agonizar un receptor de tipo Toll. Normalmente, un agonista de TLR evaluado mediante el procedimiento de la invención funcionaría de esta manera como un agonista de TLR incluso sin su resto de adsorción. Excepto cuando se indique otra cosa, Los agonistas de TLR pueden activar cualquiera de TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9 o TLR11.

Cuando el compuesto se denomina como agonista de TLR, el compuesto es preferentemente un agonista de TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10 o TLR11. Entre este grupo, un subgrupo preferido es TLR1, TLR2, TLR3, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8 y TLR11. Un subgrupo más preferido es TLR2, TLR7 y TLR8. Otro subgrupo preferido es TLR2 y TLR7.

Lo más preferible, un agonista de TLR es un agonista de un TLR humano.

Otros numerosos agonistas que aumentan la respuesta inmunitaria de un sujeto son adecuados para el uso como componentes adsorbidos para el análisis mediante el procedimiento de la invención.

Composiciones y productos farmacéuticos

El procedimiento de la invención puede utilizarse para analizar componentes adsorbidos en sales metálicas insolubles procedentes de un lote de componente adsorbido que se usa a continuación en la fabricación de composiciones y productos farmacéuticos. El lote evaluado de componente adsorbido puede formularse de numerosas maneras, y la formulación puede comprender muchos componentes adicionales.

Una composición que comprende el componente adsorbido puede generarse mediante la adición de uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Una discusión completa de dichos componentes está disponible en la referencia 40.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden el componente adsorbido están preferentemente en forma acuosa, particularmente en el punto de administración, pero pueden presentarse también en formas líquidas no acuosas o en formas secas, por ejemplo, como cápsulas de gelatina, o como liofilizados, etc., tras el análisis mediante un procedimiento de la presente invención. De esta manera, un procedimiento de la invención puede comprender la etapa de liofilizar una suspensión de un componente absorbido.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden el componente adsorbido pueden incluir uno o más conservantes, tales como tiomersal o 2-fenoxietanol. Se prefieren las composiciones exentas de mercurio, y se pueden preparar vacunas exentas de conservantes. De esta manera, un procedimiento de la invención puede comprender la etapa de añadir un conservante.

- 5 Las composiciones farmacéuticas que comprenden el componente adsorbido pueden incluir una sal fisiológica, tal como una sal de sodio, por ejemplo, para controlar la tonicidad. Es típico el cloruro de sodio (NaCl), que puede estar presente en entre 1 y 20 mg/ml por ejemplo, 10 ± 2 mg/ml o 9 mg/ml. Otras sales que pueden estar presentes incluyen cloruro de potasio, dihidrogenofosfato potásico, fosfato disódico deshidratado, cloruro de magnesio, cloruro de calcio, etc. De esta manera, un procedimiento de la invención puede comprender la etapa de añadir una sal fisiológica.

- 10 Las composiciones farmacéuticas que comprenden el componente adsorbido pueden tener una osmolalidad de entre 200 mOsm/kg y 400 mOsm/kg, por ejemplo entre 240-360 mOsm/kg, o entre 290-310 mOsm/kg. De esta manera, un procedimiento de la invención puede comprender la etapa de ajustar la osmolalidad de la suspensión del componente absorbido a entre 200 mOsm/kg y 400 mOsm/kg, por ejemplo entre 240-360 mOsm/kg, o entre 290-310 mOsm/kg. Las composiciones farmacéuticas que comprenden el componente adsorbido pueden incluir compuestos en agua corriente (por ejemplo, agua para inyección (w.f.i. por sus siglas en inglés) pero usualmente incluirán uno o más tampones. Los tampones típicos incluyen: un tampón fosfato; un tampón Tris; un tampón borato; un tampón succinato; un tampón histidina (en particular con un adyuvante de hidróxido de aluminio); o un tampón citrato. Se incluirán normalmente sales de tampón en el intervalo de 5-20 mM. De esta manera, un procedimiento divulgado
- 15 puede comprender la etapa de añadir o intercambiar el tampón en una suspensión de componente absorbido, por ejemplo, en un tampón fosfato, un tampón Tris, un tampón borato, un tampón succinato o un tampón histidina.

- 20 Las composiciones farmacéuticas que comprenden el componente absorbido tendrán normalmente un pH entre 5,0 y 9,5 por ejemplo, entre 6,0 y 8,0. De esta manera, un procedimiento de la invención puede comprender la etapa de ajustar el pH de una suspensión de componente absorbido, opcionalmente a entre 5,0 y 9,5, por ejemplo, entre 6,0 y 8,0.

Las composiciones farmacéuticas son preferentemente estériles. De esta manera, un procedimiento de la invención puede comprender la etapa de esterilizar una suspensión de componente absorbido.

- 25 Las composiciones farmacéuticas preferentemente no pirógenas por ejemplo, contienen <1 EU (unidad de endotoxina, una medida normalizada) por dosis, y preferentemente $<0,1$ UE por dosis. De esta manera, un procedimiento de la invención puede comprender la etapa de eliminar la endotoxina de una suspensión de componente absorbido.

Las composiciones farmacéuticas están preferentemente exentas de gluten. De esta manera, un procedimiento de la invención puede comprender la etapa de eliminar el gluten de una suspensión de componente absorbido.

- 30 Las composiciones farmacéuticas preparadas mediante el procedimiento de fabricación de la invención son adecuadas para la administración a pacientes animales (y, en particular, un ser humano), y de esta manera incluyen usos humanos y veterinarios. Se pueden utilizar en un procedimiento de aumentar una respuesta inmunitaria en un paciente, que comprende la etapa de administrar la composición al paciente.

- 35 Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse en forma de dosis unitaria. En algunas realizaciones, una dosis unitaria puede tener un volumen de entre 0,1-1,0 ml, por ejemplo, aproximadamente 0,5 ml. De esta manera, un procedimiento de la invención puede comprender la etapa de preparar una dosis unitaria.

- 40 Las composiciones farmacéuticas evaluadas mediante los procedimientos de la invención pueden prepararse en diversas formas. Por ejemplo, las composiciones pueden prepararse como inyectables, ya sea como soluciones líquidas o suspensiones. Las formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección pueden prepararse también (por ejemplo, una composición liofilizada o una composición para criodesecación por pulverización). La composición puede prepararse para la administración tópica, por ejemplo, como una pomada, crema o polvo. La composición puede prepararse para la administración oral por ejemplo, como un comprimido o cápsula, como una pulverización, o como un jarabe (opcionalmente aromatizado). La composición puede prepararse para la administración pulmonar, por ejemplo, mediante un inhalador, utilizando un polvo fino o un pulverizador. La composición puede prepararse como un supositorio o pesario. La composición puede prepararse
- 45 para la administración nasal, aural u ocular, por ejemplo como una pulverización o gotas. La composición puede estar en forma de kit, diseñada de tal forma que una composición combinada se reconstituya exactamente antes de la administración a un paciente. Dichos kits pueden comprender uno o más antígenos en forma líquida y uno o más antígenos liofilizados. Son usuales los inyectables para la administración intramuscular. De esta manera, un procedimiento de la invención puede comprender la etapa de preparar un inyectable.

- 50 Las composiciones comprenden una cantidad eficaz de uno o más componentes adyuvados, es decir, una cantidad que, cuando se administra a un individuo, tanto en una única dosis o como parte de una serie, es eficaz para potenciar la respuesta inmunitaria. Esta cantidad puede variar dependiendo de la salud y el estado físico del individuo que se va a tratar, la edad, el grupo taxonómico del individuo que se va a tratar (por ejemplo, primate no

humano, primate, *etc.*), la capacidad del sistema inmunitario del individuo para sintetizar anticuerpo, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, la evaluación del médico a cargo del tratamiento de la situación médica, y otros factores relevantes. La cantidad se encontrará en un intervalo relativamente amplio que se puede determinar a través de ensayos rutinarios. Se puede usar una cantidad de entre 1-1000 µg/dosis, por ejemplo, de 10-100 µg por dosis. De esta manera, un procedimiento de la invención puede comprender la etapa de diluir o concentrar el componente adsorbido para conseguir una concentración adecuada para preparar una dosis unitaria.

General

El término "que comprende" abarca "que incluye" así como "que consiste", por ejemplo, una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente de X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.

La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente" por ejemplo, una composición que está "sustancialmente exenta" de Y puede estar completamente exenta de Y. Cuando es necesario, la palabra "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

El término "aproximadamente" en relación a un valor numérico x es opcional y significa, por ejemplo, $x \pm 10\%$.

A no ser que se indique específicamente, un proceso que comprende una etapa de mezclado de dos o más componentes no requiere cualquier orden de mezclado específico. Por lo tanto, los componentes pueden mezclarse en cualquier orden. Cuando existen tres componentes entonces se pueden combinar dos componentes entre sí, y a continuación la combinación puede combinarse con el tercer componente, *etc.*

En los casos donde se usan materiales animales (y particularmente bovinos) en el cultivo de células, deben obtenerse de fuentes que existen exentas de encefalopatías espongiformes transmisibles (TSE), y en particular, exentas de encefalopatía espongiforme bovina (BSE). En general, se prefiere cultivar las células en total ausencia de materiales procedentes de animales.

En los casos donde se administre un compuesto al organismo como parte de una composición, entonces ese compuesto puede como alternativa reemplazarse por un fármaco adecuado.

El término "anticuerpo" incluye cualquiera de los diversos anticuerpos naturales y artificiales y proteínas derivadas de anticuerpos que están disponibles, y sus derivados, por ejemplo, incluyendo sin limitación anticuerpos policlonales, anticuerpo monoclonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, anticuerpos de dominio único, anticuerpos completos, fragmentos de anticuerpos tales como fragmentos $F(ab')_2$ y $F(ab)$, fragmentos F_v (heterodímeros no covalentes), anticuerpos de cadena única tales como moléculas de F_v de cadena única (scF_v), minicuerpos, oligocuerpos, fragmentos o construcciones de anticuerpos dimericos o triméricos, *etc.* El término "anticuerpo" no implica ningún origen concreto, e incluye anticuerpos obtenidos a través de procesos no convencionales, tales como expresión en fagos. Los anticuerpos para uso con la invención pueden ser de cualquier isotipo (por ejemplo, IgA, IgG, IgM, es decir, una cadena pesada α , γ o μ) y pueden tener una cadena ligera κ o λ .

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una imagen de un gel SDS-PAGE que expresa la capacidad de adsorción del hidróxido de aluminio por el antígeno NadA. Las hileras de número impar son sobrenadantes tratados con sal sódica del ácido desoxicolico (DOC) y ácido tricloroacético (TCA) de muestras adsorbidas en hidróxido de aluminio en 50, 100, 200, 400, 800 y 1600 µg ml⁻¹ de NadA. Las hileras de número par son muestras de la formulación desorbidas en aglomerados de hidróxido de aluminio con: 50, 100, 200, 400, 800 y 1600 µg ml⁻¹ de NadA. Cada muestra contenía 3000 µg ml⁻¹ de hidróxido de aluminio.

Las Figuras 2a-2g son una serie de histogramas que muestran un aumento de la fluorescencia detectada con concentraciones crecientes de NadA (FIG. 2a) 0 µg ml⁻¹ (FIG. 2b) 50 µg ml⁻¹ (FIG. 2c) 100 µg ml⁻¹ (FIG. 2d) 200 µg ml⁻¹ (FIG. 2e) 400 µg ml⁻¹ (FIG. 2f) 800 µg ml⁻¹ y (FIG. 2g) 1600 µg ml⁻¹. El pico a la izquierda de cada imagen representa partículas de hidróxido de aluminio sin componente adsorbido. Con concentraciones crecientes, se observa que una proporción más grande de partículas se desplaza a la derecha, indicando un elevado nivel de fluorescencia de una marca unida específicamente a NadA.

La Figuras 3a-3d son una serie de histogramas que muestran los resultados de los ensayos de autofluorescencia de los componentes de la prueba. Los histogramas representan el recuento de casos frente a la fluorescencia medida para el canal 660/20 de APC-A. (FIG. 3a) El análisis del hidróxido de aluminio mediante citometría de flujo identifica el 99% de los agregados que tienen una intensidad de la fluorescencia menor de 1000. (FIGS. 3b, 3c, 3d) Análisis similares del hidróxido de aluminio junto con los componentes de la prueba (NadA (b), NadA + BSA (FIG. 3c), y NadA, BSA y anticuerpo de conejo dirigido contra NadA (FIG. 3d)) no indicaron fluorescencia inherente sobre el nivel de fondo para el antígeno NadA, el agente de bloqueo (BSA) o por el anticuerpo primario.

Las Figuras 4a-4c son una serie de histogramas que muestran la especificidad de unión del anticuerpo a NadA adsorbido en hidróxido de aluminio. Los histogramas representan los recuentos de casos en porcentaje (%) frente a la intensidad de la fluorescencia relativa medida para el APC-Alexa 647 en el canal 660/20 para diversos

controles de muestras. (FIG. 4a) Se determinó la unión no específica llevando a cabo la prueba de la citometría de flujo en ausencia de antígeno con anticuerpo primario diluido 1:1000 y 1:1000 o conteniendo $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ de NadA pero utilizando anticuerpo primario irrelevante. (FIG. 4b) El tratamiento con BSA fue satisfactorio en el bloqueo del nivel de fluorescencia de las partículas de hidróxido de aluminio (pico de la izquierda) en 10 veces menor a los niveles medidos para la prueba completa con NadA formulado a $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ (pico de la derecha). (FIG. 4c) La prueba es muy reproducible, y solo se observó una variación menor en la prueba entre formulaciones idénticas en el momento 0 y 24 además o después de 24 h de espera tras la tinción del anticuerpo (tres picos solapantes).

La Figura 5 es una representación de las gráficas de dispersión de todas las formulaciones normalizadas ($0-300 \mu\text{g ml}^{-1}$). Los puntos cerrados aparecieron como una única población uniforme de partículas con concentraciones crecientes de NadA que no tienen impacto en las medidas de dispersión directa y lateral.

Las Figuras 6a-6g son una serie de gráficas de dispersión que forman un análisis de la distribución de antígeno de NadA sobre agregados de hidróxido de aluminio utilizando dispersión lateral y una intensidad de la fluorescencia relativa (IFR). El porcentaje de partículas fluorescentes aumenta con la concentración de NadA (0, 9,375, 18,75, 37,5, 75, 150, $300 \mu\text{gml}^{-1}$).

La Figura 7 es una gráfica de una curva patrón de concentración de NadA en la prueba de citometría de flujo calculada con un análisis de regresión no lineal de tres parámetros ($y=ax^3+bx^2+cx$) con coeficientes de correlación $R^2 > 0,99$. El eje y presenta el porcentaje de partículas con intensidad de la fluorescencia relativa >1000 . Cada valor representa la media y las desviaciones estándar de muestras por triplicado llevadas a cabo en tres experimentos independientes. Los resultados mostraron la detección del antígeno MenB de NadA en el intervalo de 3,12- $100 \mu\text{g/dosis}$ ($6,24-200 \mu\text{g ml}^{-1}$).

La Figura 8 es una gráfica que muestra el perfil de excitación de numerosos SMIP.

Las Figuras 9a-9d son una serie de gráficas de dispersión que proporcionan un análisis morfológico de la formulación de hidróxido de aluminio-Compuesto C y los controles basados en los parámetros de dispersión directa y lateral (FSC y SSC). (FIG. 9a) Hidróxido de aluminio, (FIG. 9b) Compuesto C (FIG. 9c) Compuesto C filtrado y (FIG. 9d) Compuesto C absorbido en hidróxido de aluminio.

Las Figuras 10a-10c son una serie de gráficas de dispersión que proporcionan un análisis morfológico de la formulación de hidróxido de aluminio + Compuesto A y los controles relativos basándose en los parámetros de dispersión directa y lateral (FSC y SSC). (FIG. 10a) Hidróxido de aluminio, (FIG. 10b) Compuesto A, (FIG. 10c) Compuesto A con hidróxido de aluminio.

Las Figuras 11a-11n muestran una serie de histogramas que muestran el desplazamiento del pico de fluorescencia positivo detectado con el anticuerpo secundario marcado, específico de 961c. El desplazamiento a la derecha es directamente proporcional a la cantidad de 961c adsorbido sobre partículas de hidróxido de aluminio absorbido solo con 961c (FIGS. 11a-11g), y cuando este componente se adsorbió como parte de una combinación de 3 componentes (FIGS. 11h-11n). (FIGS. 11a, 11h) $0 \mu\text{g ml}^{-1}$, (FIGS. 11b, 11i) $50 \mu\text{g ml}^{-1}$, (FIGS. 11c, 11j) $100 \mu\text{g ml}^{-1}$, (FIGS. 11d, 11k) $150 \mu\text{g ml}^{-1}$, (FIGS. 11e, 11l) $200 \mu\text{g ml}^{-1}$, (FIGS. 11f, 11m) $250 \mu\text{g ml}^{-1}$, (FIGS. 11g,) $400 \mu\text{g ml}^{-1}$, y (FIGS. 11n) $300 \mu\text{g ml}^{-1}$.

Las Figuras 12a-12c son una serie de histogramas que muestran trazas de fluorescencia para las formulaciones de hidróxido de aluminio para el Compuesto B (FIG. 12a) y el Compuesto C (FIG. 12b). Los histogramas muestran una intensidad de la fluorescencia aumentada de las partículas de SMIP-hidróxido de aluminio (ambas en presencia y ausencia de un antígeno) con respecto a los controles negativos. Este aumento es independiente de si el hidróxido de aluminio tiene un componente de proteína absorbida en este o no. El hidróxido de aluminio mezclado con el Compuesto A (FIG. 12c), por el contrario, no muestra fluorescencia ya que el Compuesto A no se adsorbe sobre las partículas de hidróxido de aluminio.

La Figura 13a es un histograma que muestra que antes de la adsorción y tras la desorción de SMIP del Compuesto B, las partículas de hidróxido de aluminio no fluorescen de la misma manera que cuando se adsorbe el Compuesto B y la Figura 13b es un histograma que muestra que antes de la adsorción y tras la desorción de SMIP del Compuesto C, las partículas de hidróxido de aluminio no fluorescen de la misma manera que cuando se adsorbe el Compuesto C.

La Figura 14 es una gráfica que muestra el perfil de excitación de dos SMIP adicionales.

Las Figuras 15a-15d son una serie de gráficas de dispersión que proporcionan un análisis morfológico de la formulación de hidróxido de aluminio-Compuesto E y los controles basados en los parámetros de dispersión directa y lateral (FSC y SSC) y una serie de histogramas que muestran las trazas de la fluorescencia para las formulaciones de hidróxido de aluminio para el Compuesto E.

MODOS PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

Se puede obtener información adicional para implementar la invención de la referencia 41.

ANÁLISIS DE CITOMETRÍA DE FLUJO DE LA PROTEÍNA ADSORBIDA

Materiales

Se utilizó material de calidad clínica (GMP) de un antígeno de proteína recombinante de *Neisseria meningitidis* serogrupo B (MenB). Se usó NadA para los experimentos. Se utilizó anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra NadA como anticuerpo primario a una dilución 1:500 en tampón histidina 10 mM, pH 6,5. Se adquirió un fragmento F(ab')₂ conjugado con Alexa Fluor 647 de un anticuerpo de cabra dirigido contra Ig de conejo de Molecular Probes y se utilizó a una dilución 1:800 en 1X PBS. Este anticuerpo se utilizó en la etapa final de la prueba.

Preparación de formulaciones de patrones y muestras

Se preparó un conjunto de suspensiones patrón que contenían el antígeno NadA a 300 µg ml⁻¹ y cinco diluciones en serie dos veces diluyendo en serie una muestra de suspensión madre el día antes de la prueba.

La suspensión madre se preparó mezclando 1500 µg de hidróxido de aluminio por 150 µg de NadA en tampón histidina 10 mM (pH 6,5). La osmolaridad final de la formulación se ajustó a 300 mOsm/l utilizando una solución de NaCl 2 M. La concentración de hidróxido de aluminio en la solución madre era de 3000 µg ml⁻¹ y la concentración de NadA era de 300 µg ml⁻¹. El antígeno se adsorbió agitando la suspensión madre durante al menos dos horas a 4°C. Posteriormente, la suspensión madre se diluyó en serie, a 9,38 µg ml⁻¹, mezclando 1 ml de suspensión de hidróxido de aluminio-antígeno con 1 ml de suspensión de hidróxido de aluminio, que se había ajustado anteriormente para la concentración, el pH y la osmolaridad. Las muestras se utilizaron para la evaluación después de una incubación durante la noche con movimiento rotatorio a 4°C. Para cada prueba, muestras en blanco que contenían 3000 µg ml⁻¹ de hidróxido de aluminio, a pH y osmolaridad ajustados, se incluyeron como parte del conjunto normalizado. En paralelo, se prepararon seis muestras de verificación del patrón que contenían 6,25, 12,5, 25, 50 100 y 200 µg ml⁻¹ de antígeno, de forma independiente mediante una dilución individual de otra muestra de suspensión madre de 3000 µg ml⁻¹ de hidróxido de aluminio con 300 µg ml⁻¹ de NadA preparado exactamente como se ha descrito anteriormente. El volumen de la dosis y la concentración de hidróxido de aluminio para cada muestra estándar y muestra de verificación fueron respectivamente 500 µl y 1500 µg/dosis (dosis humana).

Se evaluó la capacidad de unión del hidróxido de aluminio (3000 µg ml⁻¹ en histidina 10 mM pH 6,5, 300 mOsm/l) para algunas formulaciones de NadA a 50, 100, 200, 400, 800 y 1600 µg ml⁻¹. Para determinar la adsorción del antígeno, se centrifugó cada formulación a 3000 g durante 20 minutos y se eliminó el sobrenadante sin perturbar el aglomerado. Para precipitar los posibles antígenos no unidos, los sobrenadantes se trataron con sal sódica del ácido desoxicolico al 0,5% (DOC), se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente, seguido por la adición de ácido tricloroacético al 60% (TCA). Los aglomerados de TCA se volvieron a suspender con tampón de muestra mientras que los aglomerados de aluminio se reconstituyeron con tampón de muestra que contenía fosfato de sodio 0,5 M a pH 8. Las muestras se cargaron en un gel Bis-Tris Midi con un gradiente de NUPAGE Novex al 4-12% y se analizaron en condiciones reductoras a una tensión constante de 200 V durante aproximadamente 50 minutos. Los geles se tiñeron-destiñeron con el kit de tinción del azul coloidal.

A la dosis clínica de 50 µg (100 µg ml⁻¹), el antígeno NadA se adsorbió predominantemente en el adyuvante de hidróxido de aluminio. Cualquier antígeno no adsorbido en la formulación de sobrenadante estaba por debajo del límite de detección (<2%; Figura 1). Además, el NadA no adsorbido en la formulación de sobrenadante no fue detectable a una concentración de antígeno de 800 µg/ml indicando ≥ 98% de adsorción a esta concentración de antígeno. El antígeno fue, sin embargo, detectable a 1600 µg/ml indicando que la capacidad de adsorción de 1500 µg de hidróxido de aluminio para NadA se encuentra comprendida entre 800 y 1600 µg/ml de NadA, y que en la dosis clínica de 50 µg, la cantidad de NadA adsorbida está significativamente por debajo del límite de la capacidad de adsorción del adyuvante de 1500 µg por dosis en histidina 10 mM pH 6,5.

Prueba de citometría de flujo

La prueba utilizada para analizar el NadA adsorbido en hidróxido de aluminio insoluble era un procedimiento en tres etapas: la saturación de los sitios libres en el hidróxido de aluminio, la unión primaria con un anticuerpo que reconoce específicamente el antígeno NadA y la tinción con un anticuerpo secundario marcado fluorescentemente que se une al primer anticuerpo.

En primer lugar, se añadió el BSA a la composición del componente adsorbido, seguido por una incubación durante 30 min a 4°C utilizando un mezclador rotatorio vertical. Tras esta etapa, se añadió el anticuerpo primario y se continuó con una incubación adicional durante 30 minutos a 4°C utilizando un mezclador rotatorio vertical. El anticuerpo secundario se añadió tras incubación durante 20 minutos a temperatura ambiente sin mezcla, en la oscuridad. Las muestras en blanco, patrón y de verificación se colocaron en placas de polipropileno de 96 micropocillos. Las suspensiones de 75 µl/pocillo se saturaron con 25 µl de BSA al 10% en tampón histidina 10 mM pH 6,5. Después de la incubación, se centrifugaron las placas (3000g durante 5 minutos) y se retiraron los sobrenadantes. A continuación los aglomerados de aluminio se lavaron y centrifugaron dos veces con 100 µl de tampón histidina 10 mM pH 6,5. Para reducir el fondo, el anticuerpo primario, anticuerpo de conejo dirigido contra NadA, se preadsorbió con suero de cabra (diluido 1/10 en tampón histidina pH 6,5) y se diluyó posteriormente hasta 1/500 en tampón histidina pH 6,5. Los aglomerados lavados se volvieron a suspender con 75 µl de tampón histidina,

pH 6,5 y se añadieron posteriormente 75 µl de anticuerpo primario. A continuación, se incubaron las muestras y se lavaron-centrifugaron como se ha descrito anteriormente. Un anticuerpo de cabra dirigido contra Ig de conejo, marcado fluorescentemente con Alexa Fluor 647®, se diluyó 1/800 en PBS 1X y a continuación se añadió a cada pocillo. Después de la incubación, las placas se lavaron y se centrifugaron y se volvieron a suspender en 1X PBS. Las muestras tratadas se leyeron y adquirieron sobre un FACSCanto™ II usando un filtro para el canal de APC-A (660/20 nm).

Autofluorescencia de los componentes de la prueba

El análisis del hidróxido de aluminio mediante citometría de flujo identifica el 99% de los agregados que tienen una intensidad de la fluorescencia menor de 1000. Un análisis similar del hidróxido de aluminio junto con los componentes de la prueba indicó que no había fluorescencia inherente en este nivel de fondo para el antígeno de NadA, el BSA utilizado como un agente de bloqueo y los anticuerpos primarios (Figuras 2a-2g).

Efecto de los sistemas de tampones de prueba sobre la adsorción de antígenos

La adsorción de antígenos en adyuvantes de hidróxido de aluminio depende del pH, la fuerza iónica y la presencia de aniones tales como fosfato (referencia 42). Por lo tanto, era necesario evaluar la influencia de las condiciones de prueba sobre la adsorción de NadA.

Se midió la cantidad de antígeno que se libera desde el hidróxido de aluminio durante cada uno del bloqueo, la tinción y el lavado en el sobrenadante de la muestra de prueba después de cada una de estas etapas (no se muestran los datos). El antígeno eluido no fue detectable en el sobrenadante hasta la incubación con el anticuerpo secundario y la etapa de lavado final con PBS. Algo del antígeno se desplazó desde el hidróxido de aluminio durante el lavado final con PBS. Se encontró que este estaba en el intervalo del 5% al 10% del antígeno presente en la formulación. La sustitución de PBS con tampón histidina para este lavado final fue capaz de aliviar este efecto sin antígeno detectable liberado en el tampón de lavado (no se muestran los datos). Se descubrió que pérdida de antígeno tras el intercambio con un tampón PBS no tenía un efecto significativo de la capacidad predictiva de la prueba a determinar, de forma fiable y precisa, la concentración del antígeno unido a la sal metálica insoluble (véase la Tabla 3).

Además, a pesar de estas observaciones, el antígeno permaneció predominantemente unido al hidróxido de aluminio con recuperación de la mayoría del antígeno procedente del hidróxido de aluminio una vez que se ha completado el procedimiento de tinción del anticuerpo.

Especificidad de la unión del anticuerpo frente al antígeno adsorbido en aluminio

El análisis de la intensidad de la fluorescencia de la formulación estándar confirmó que para el hidróxido de aluminio a 3000 µg ml⁻¹ que no contenía NadA, la mayoría de los agregados de adyuvante (> 99%) tenían una intensidad de la fluorescencia menor de 1000 (Figura 3b). Aunque a la concentración de NadA de 100 µg ml⁻¹ (dosis humana), los agregados tuvieron un notable aumento en la fluorescencia relativa con una fluorescencia relativa media 9,6 veces mayor que la observada para la formulación de NadA. Dado que se han notificado anticuerpos que se adsorben en adyuvante de hidróxido de aluminio mediante un intercambio de ligandos e interacciones electrostáticas, era necesario investigar si existe cualquier unión no específica de los anticuerpos primario y secundario en hidróxido de aluminio en la formulación.

Para tener en cuenta cualquier unión no específica, se bloqueó el hidróxido de aluminio con BSA al 2,5% antes de la tinción con los anticuerpos primario y secundario. Este bloqueo tuvo éxito en limitar la unión no específica, como se lleva a cabo, la prueba de citometría de flujo en ausencia de antígeno con anticuerpos primarios diluidos 1:1000 y 1:10000 dio como resultado niveles de fluorescencia para las partículas de hidróxido de aluminio 10 veces por debajo de los niveles observados para la prueba completa con NadA formulado a 100 µg ml⁻¹ (Figura 3a). Además, cuando se llevó a cabo la prueba con anticuerpos primarios irrelevantes no específicos para NadA, los niveles de fluorescencia permanecieron iguales a los observados en ausencia de antígeno, indicando que la unión no específica entre NadA y el anticuerpo secundario marcado fluorescentemente no es significativa (Figura 3a).

Para evaluar la estabilidad y reproducibilidad de la prueba, se prepararon múltiples formulaciones en paralelo, pero se tiñeron y/o analizaron mediante citometría de flujo en diferentes intervalos de tiempo (Figura 3c). Estos datos indican que la prueba es muy reproducible debido a que se observó poca variación entre formulaciones idénticas evaluadas con 24 horas de espera. Además, la prueba es estable ya que la espera de 24 horas tras el procedimiento de tinción del anticuerpo de la prueba tuvo poco impacto sobre los niveles de fluorescencia medidos mediante el análisis de citometría de flujo.

Morfología y distribución del antígeno de las formulaciones convencionales

Formulaciones convencionales, preparadas a partir de una solución madre de 300 µg ml⁻¹ para NadA y diluidas 2 veces en serie cinco veces con una suspensión de hidróxido de aluminio, se analizaron mediante citometría de flujo usando parámetros de dispersión directa (FSC) y lateral (SSC) asociados con el tamaño de partículas y la morfología respectivamente. Todas las formulaciones convencionales aparecieron como una única población

uniforme de partículas (Figuras 4a-4c) con concentraciones crecientes de NadA adsorbido que no tienen impacto en las medidas de dispersión directa y lateral. Se analizó la distribución del antígeno de NadA sobre agregados de hidróxido de aluminio utilizando SSC y la intensidad de la fluorescencia relativa (IFR). El análisis de la IFR desveló que la suspensión no tenía antígeno adsorbido, 99% de los agregados mostraron una IFR <1000. Sin embargo, a medida que la concentración de NadA aumentaba gradualmente, la intensidad de la fluorescencia aumentó proporcionalmente a la cantidad de antígeno adsorbido (Figura 5). Cuando se cargaron partículas de hidróxido de aluminio con la concentración más elevada (300 µg ml⁻¹), la suspensión completa se expuso a una fluorescencia uniforme 23 veces mayor que el hidróxido de aluminio solo.

Cuantificación directa del antígeno de NadA adsorbido en la formulación de vacuna

Se prepararon formulaciones convencionales en el intervalo de 0-100 µg ml⁻¹ y se probaron mediante la prueba de citometría de flujo. Las curvas patrón generadas mediante análisis de regresión no lineal de tres parámetros tenían coeficientes de correlación $R^2 > 0,99$ (Figuras 6a-6g). Para evaluar la fiabilidad de las curvas patrón para medir las concentraciones de antígeno, se evaluaron una serie de muestras de prueba en el mismo intervalo de concentración y se determinó su concentración de proteínas a partir de las lecturas de fluorescencia (Tabla 3). Los resultados mostraron que la prueba de citometría de flujo es precisa y viable con un porcentaje total de precisión de las formulaciones de prueba en el intervalo de 85% o más.

Estudio de desplazamiento factorial *in vitro*

Se llevó a cabo un estudio de desplazamiento *in vitro* para determinar si la proteína BSA, utilizada como agente de bloqueo, o los anticuerpos primarios o secundarios interfieren con el antígeno adsorbido desplazando este del hidróxido de aluminio durante la prueba. El experimento se llevó a cabo en placas de polipropileno de 96 micropocillos en forma de U. Se mezclaron alícuotas de 75 µl de una muestra de dosis clínica con solución de bloqueo de BSA, seguido por los anticuerpos primarios y secundario. La adición de cada reactivo fue seguida por 30 minutos de incubación a 4°C, 20 minutos para el anticuerpo secundario, seguido por etapas de lavado. Tras cada incubación, el sobrenadante se mantuvo para el análisis adicional. La presencia de la proteína MenB en los sobrenadantes se evaluó mediante SDS-PAGE y la proteína se puso en evidencia mediante la transferencia western utilizando el mismo anticuerpo policlonal usado para la prueba.

Análisis de suspensiones con más de un componente adsorbido

Otra ventaja común de las pruebas basadas en anticuerpo específica de un antígeno diana es el potencial de la prueba que se va a aplicar directamente a las formulaciones complejas que contienen múltiples antígenos y adyuvantes tales como vacunas combinadas. Se aplicó la prueba a una vacuna trivalente que contenía GNA2091-1870 y GNA2132-1030 además de NadA, y no se encuentra interferencia de estos antígenos en determinar las concentraciones adsorbidas de NadA.

Discusión

Además de la precisión, sensibilidad y reproducibilidad, la prueba de citometría de flujo posee otras numerosas ventajas clave que surgen del hecho de que la citometría de flujo analiza las partículas físicas midiendo el antígeno directamente sobre la superficie de las partículas de aluminio. En primer lugar, se mide el grado de adsorción del antígeno en hidróxido de aluminio directamente sin la confianza en mediciones indirectas de antígeno no adsorbido en sobrenadantes de la formulación. En segundo lugar, dado que la prueba puede estar basada en anticuerpos, es posible utilizar la citometría de flujo para vigilar la estabilidad del antígeno mientras sigue unido a la superficie de los adyuvantes de sales metálicas insolubles. Esto podría ser particularmente interesante para los antígenos que tienen epítomos protectores bien definidos, y donde podrían utilizarse anticuerpos monoclonales específicos de estas regiones en la prueba de citometría de flujo para vigilar la integridad estructural de los epítomos con el tiempo o para vigilar la consistencia de la vacuna antes de la liberación. Finalmente, otra ventaja potencial de esta prueba es que es capaz de determinar las concentraciones de proteínas sobre cada partícula de sal metálica insoluble que puede desvelar la uniformidad de la distribución del antígeno en la formulación. Con directrices en la bibliografía (por ejemplo, referencia 43) que describen diferentes estrategias de adsorción para la producción de vacunas multicomponente, las pruebas basadas en citometría de flujo podrían ayudar a vigilar la uniformidad de las vacunas resultantes y la importancia de la distribución del antígeno sobre la eficacia.

ANÁLISIS DE CITOMETRÍA DE FLUJO DE LAS MOLÉCULAS PEQUEÑAS ADSORBIDAS

Se puede usar la tecnología basada en citometría de flujo (CF) para la detección directa de SMIP sobre hidróxido de aluminio sin necesidad de marcar. La prueba se realizó utilizando una nueva clase de agonistas TLR7 que son análogos del compuesto de plomo del Compuesto A. La benzonaftiridina es la estructura principal de la serie y las moléculas tienen características de fluorescencia intrínsecas. La asociación de SMIP con hidróxido de aluminio transforma las partículas de sales metálicas insolubles simples que presentan etiquetas fluorescentes, detectables con citometría de flujo, combinando las propiedades de dispersión de la luz con la intensidad de la fluorescencia tras la excitación adecuada.

La espectroscopía de fluorescencia confirmó que el Compuesto A, el Compuesto C, el Compuesto B, el Compuesto

E y el Compuesto H pueden excitarse en el espectro visible del violeta y emiten fluorescencia en el espectro visible del azul/verde con ligeras diferencias en la longitud de onda (Figuras 8 y 14).

Se analizaron formulaciones basadas en hidróxido de aluminio en sistema FACS Canto II y se caracterizaron mediante parámetros morfológicos asociados (FSC y SSC). Los controles negativos incluyeron hidróxido de aluminio solo, soluciones de moléculas pequeñas, una vacuna de PBS y Alum-3 MenB (Las Figuras 9a-9d muestran los resultados de estos experimentos para el Compuesto C).

Se clasificó hidróxido de aluminio en solitario para cubrir una población homogénea y compacta, que se basó en cribar decenas de miles de casos para determinar la dispersión de luz de la luz emitida por una fuente de láser azul a 488 nm. El análisis de una solución del Compuesto C y el PBS del control dio como resultado la falta de detección de partículas a través de la dispersión de la luz sobre el ruido de fondo del instrumental. La clasificación cubrió la mayoría de las partículas de alum (más del 90%) y se aplicó a todas las muestras diferentes y se utilizó para evaluar la intensidad de la fluorescencia. La filtración de las soluciones SMIP ayudó a evitar la dispersión de las partículas precipitadas o la precipitación simultánea de SMIP e hidróxido de aluminio cuando se formularon juntos. Se clasificó hidróxido de aluminio solo para cubrir una población homogénea y compacta (Figura 10a). La clasificación se aplicó al Compuesto A y no se podría encontrar solapamiento de la dispersión de la luz (Figura 10b). Cuando se mezclan juntos se comportan como dos poblaciones diferentes (Figura 10c), en contraste a la única población homogénea observada cuando se absorbió el Compuesto C en hidróxido de aluminio. El Compuesto E se adsorbió también en hidróxido de aluminio y se comportó como una única población (Figuras 15a-15d).

Las partículas de hidróxido de aluminio incluidas en la clasificación aplicada se analizaron para su intensidad de la fluorescencia en FACS Canto II usando el láser violeta (405 nm) como fuente de excitación y dos filtros diferentes para la emisión: 525/50 nm y 450/50 nm (Figuras 10a-10c).

Se utilizó un protocolo de desorción para confirmar adicionalmente la unión de los SMIP al hidróxido de aluminio. La formulación de SMIP-hidróxido de aluminio se trató con un tampón fosfato 0,5 M (pH 9) y el hidróxido de aluminio desorbido se lavó tanto con agua (para los compuestos solubles) como butanol (para los compuestos poco solubles en agua). A continuación se analizó el hidróxido de aluminio de nuevo sobre FACS Canto II, utilizando los mismos ajustes para el instrumento, y no mostró fluorescencia similar el hidróxido de aluminio solo (Figuras 11a-11n).

Las propiedades de fluorescencia de los SMIP TLR7 se han explicado completamente para desarrollar una novedosa prueba para la detección directa de SMIP en hidróxido de aluminio. La citometría de flujo demostró ser una herramienta única para la caracterización cualitativa de las formulaciones de SMIP-hidróxido de aluminio incluso en presencia de antígenos (véanse las Figuras 12a y 12b). La adsorción de los SMIP sobre hidróxido de aluminio está también apoyada por la observación de las partículas de SMIP-hidróxido de aluminio que tienen características fluorescentes con respecto a un control negativo, la dispersión de la luz de las SMIP solubles era despreciable, la dispersión de la luz de las SMIP insolubles (Compuesto A, no absorbido sobre hidróxido de aluminio) tenía diferente morfología, el hidróxido de aluminio vuelve a su estado de fluorescencia negativa tras la desorción de SMIP. Se utilizaron también las propiedades de fluorescencia para confirmar la asociación de los SMIP sobre el hidróxido de aluminio mediante microscopía confocal.

La fluorescencia de SMIP puede explicarse adicionalmente para evaluar la captación de SMIP in vitro por los macrófagos mediante citometría de flujo como una herramienta poderosa para entender la localización de los SMIP en las células y entender el efecto de las formulaciones de hidróxido de aluminio sobre la internalización de los agonistas de TLR. Los análisis preliminares mostraron que este tipo de prueba es factible.

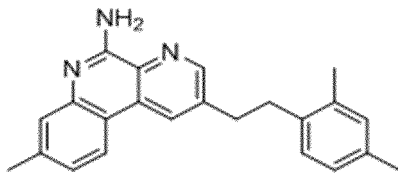
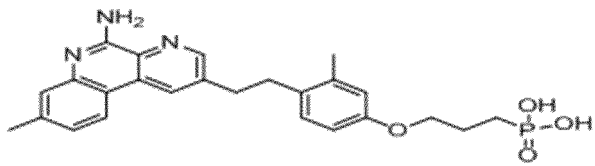
Tabla 1: Marcas fluorescentes comúnmente utilizadas

Colorantes	Longitud de onda de la absorbancia	Longitud de onda de emisión	Color visible
Hidroxycumarina	325	386	azul
metoxicumarina	360	410	azul
Alexa fluor	345	442	azul
aminocumarina	350	445	azul
Cy2	490	510	verde (oscuro)
FAM	495	516	verde (oscuro)
Alexa fluor 488	494	517	verde (claro)
Fluoresceína FITC	495	518	verde (claro)
Alexa fluor 430	430	545	verde (claro)

(continuación)

Colorantes	Longitud de onda de la absorbanza	Longitud de onda de emisión	Color visible
Alexa fluor 532	530	555	verde (claro)
HEX	535	556	verde (claro)
Cy3	550	570	amarillo
TRITC	547	572	amarillo
Alexa fluor 546	556	573	amarillo
Alexa fluor 555	556	573	amarillo
R-ficoeritrina (PE)	480;565	578	amarillo
Rodamina Red-X	560	580	naranja
Tamara	565	580	rojo
Cy3,5 581	581	596	rojo
Rox	575	602	rojo
Alexa fluor 568	578	603	rojo
Red 613	480;565	613	rojo
Texas Red	615	615	rojo
Alexa fluor 594	590	617	rojo
Alexa fluor 633	621	639	rojo
Aloficocianina	650	660	rojo
Alexa fluor 633	650	668	rojo
Cy5	650	670	rojo
Alexa fluor 660	663	690	rojo
Cy5.5	675	694	rojo
TruRed	490;675	695	rojo
Alexa fluor 680	679	702	rojo
Cy7	743	770	rojo

Tabla 2: Agonistas TLR

Agonista TLR7	Estructura
Compuesto A	
Compuesto B	

(continuación)

Agonista TLR7	Estructura
Compuesto C	
Compuesto D	
Compuesto E	
Compuesto F	
Compuesto G	
Compuesto H	

Tabla 3: Comparación de la concentración nominal y la concentración detectada mediante la prueba de citometría de flujo

Concentración nominal ^a (µg/500 µl)	Concentración detectada ^b (µg/500 µl)	Precisión ^c (%)	CV ^d (%)
3,12	3,01+/-0,1	94,8+/-2,1	4,8
6,25	6,27+/-0,3	96,4+/-2,8	4,8
12,5	12,79+/-0,2	97,6+/-1,6	1,6
25	24,87+/-0,8	97,5+/-2,0	3,4

(continuación)

Concentración nominala ($\mu\text{g}/500 \mu\text{l}$)	Concentración detectadab ($\mu\text{g}/500 \mu\text{l}$)	Precisiónc (%)	CVd (%)
50	50,5+/-2,8	94,8+/-1,5	5,7
100	113,98+/-12,3	84,7+/-10,1	10,8
^a Las muestras de ensayo de NadA sobre hidróxido de aluminio se formularon recientemente y se diluyeron a una concentración final con una suspensión de hidróxido de aluminio (3.0 mg/ml) ^b se llevó a cabo un cálculo posterior convirtiendo el porcentaje de la lectura de fluorescencia de las concentraciones patrón de antígeno utilizando un análisis de regresión no lineal de tres parámetros. ^c % de precisión es el porcentaje de similitud entre la cantidad de NadA calculada mediante cálculo posterior (detectado mediante la prueba de la citometría de flujo) y la cantidad conocida de NadA ^d CV, coeficiente de variación entre las pruebas, CV se calcula como la desviación estándar dividida por la media			

REFERENCIAS

- [1] WO2004/038417.
- [2] Thiele y col. (1990) J Clin Lab Anal 4:126-9.
- 5 [3] Lai y col. (2008) Applied Spectroscopy 62:784-90.
- [4] Zhu y col. (2009) J Immunol Methods 344:73-8.
- [5] The Molecular Probes® Handbook-A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies (11th Ed.; Invitrogen)
- [6] Solicitud de patente internacional PCT/IB2010/002386.
- 10 [7] Vaccine Design... (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.
- [8] Treanor y col. (1996) J Infect Dis 173:1467-70.
- [9] Keitel y col. (1996) Clin Diagn Lab Immunol 3:507-10.
- [10] WO03/097091.
- [11] Cassone & Torosantucci (2006) Expert Rev Vaccines 5:859-67.
- 15 [12] PCT/IB2010/052445.
- [13] PCT/IB2010/000998.
- [14] Giuliani y col. (2006) Proc Natl Acad Sci USA. 103:10834-9.
- [15] WO95/27787.
- [16] WO03/010317.
- 20 [17] WO2007/110700.
- [18] WO2006/138004.
- [19] WO2005/084306.
- [20] WO2005/002619.
- [21] WO03/049762.
- 25 [22] WO02/02606.
- [23] WO00/37494.
- [24] WO2008/020330.
- [25] WO2006/091517.
- [26] WO2006/089264.
- 30 [27] Covacci & Rappuoli (2000) J. Exp. Med. 19:587-592.
- [28] WO 93/18150.
- [29] Covacci y col. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5791-5795.
- [30] Tummuru y col. (1994) Infect. Immun. 61:1799-1809.
- [31] Marchetti y col. (1998) Vaccine 16:33-37.
- 35 [32] Telford y col. (1994) J. Exp. Med. 179:1653-1658.
- [33] Evans y col. (1995) Gene 153:123-127.
- [34] WO 96/01272 & WO96/01273, especialmente SEQ ID NO:6.
- [35] WO 97/25429.
- [36] MMWR Morb Mortal Wkly Rep 16 ene 1998;47(1):12, 19.
- 40 [37] Harper y col. (2004) Lancet 364(9447):1757-65.
- [38] US 6,699,474.
- [39] WO2007/060548.
- [40] Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Gennaro, 2000; 20ª edición, ISBN: 0683306472).
- [41] Ugozzoli y col. (2011) Analytical Biochemistry 418:224-230.
- 45 [42] Hem y HogenEsch (2007) Expect Rev Vaccines 6:685-698.
- [43] Matheis y col. (2001) Vaccine 20:67-73.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Novartis AG

<120> ANÁLISIS DE CITOMETRÍA DE FLUJO DE MATERIALES ADSORBIDOS EN SALES METÁLICAS

<130> PAT054336-WO-PCT

<140> PCT/US2011/ _____

<141> 14-12-2011

<150> US 61/423.001

<151> 14-12-2010

<160> 5

<170> SeqWin2010, versión 1.0

<210> 1

<211> 327

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Inmunógeno para *Neisseria meningitidis*

<400> 1

Ala	Thr	Asn	Asp	Asp	Asp	Val	Lys	Lys	Ala	Ala	Thr	Val	Ala	Ile	Ala	
1				5					10					15		
Ala	Ala	Tyr	Asn	Asn	Gly	Gln	Glu	Ile	Asn	Gly	Phe	Lys	Ala	Gly	Glu	
			20					25					30			
Thr	Ile	Tyr	Asp	Ile	Asp	Glu	Asp	Gly	Thr	Ile	Thr	Lys	Lys	Asp	Ala	
		35					40					45				
Thr	Ala	Ala	Asp	Val	Glu	Ala	Asp	Asp	Phe	Lys	Gly	Leu	Gly	Leu	Lys	
	50					55					60					
Lys	Val	Val	Thr	Asn	Leu	Thr	Lys	Thr	Val	Asn	Glu	Asn	Lys	Gln	Asn	
65					70					75					80	
Val	Asp	Ala	Lys	Val	Lys	Ala	Ala	Glu	Ser	Glu	Ile	Glu	Lys	Leu	Thr	
				85					90					95		
Thr	Lys	Leu	Ala	Asp	Thr	Asp	Ala	Ala	Leu	Ala	Asp	Thr	Asp	Ala	Ala	
			100					105					110			
Leu	Asp	Ala	Thr	Thr	Asn	Ala	Leu	Asn	Lys	Leu	Gly	Glu	Asn	Ile	Thr	
	115						120					125				
Thr	Phe	Ala	Glu	Glu	Thr	Lys	Thr	Asn	Ile	Val	Lys	Ile	Asp	Glu	Lys	
	130					135					140					
Leu	Glu	Ala	Val	Ala	Asp	Thr	Val	Asp	Lys	His	Ala	Glu	Ala	Phe	Asn	
145					150					155					160	
Asp	Ile	Ala	Asp	Ser	Leu	Asp	Glu	Thr	Asn	Thr	Lys	Ala	Asp	Glu	Ala	
				165					170					175		
Val	Lys	Thr	Ala	Asn	Glu	Ala	Lys	Gln	Thr	Ala	Glu	Glu	Thr	Lys	Gln	
			180					185					190			

```

Asn Val Asp Ala Lys Val Lys Ala Ala Glu Thr Ala Ala Gly Lys Ala
 195                               200                               205

Glu Ala Ala Ala Gly Thr Ala Asn Thr Ala Ala Asp Lys Ala Glu Ala
 210                               215                               220

Val Ala Ala Lys Val Thr Asp Ile Lys Ala Asp Ile Ala Thr Asn Lys
 225                               230                               235                               240

Asp Asn Ile Ala Lys Lys Ala Asn Ser Ala Asp Val Tyr Thr Arg Glu
 245                               250                               255

Glu Ser Asp Ser Lys Phe Val Arg Ile Asp Gly Leu Asn Ala Thr Thr
 260                               265                               270

Glu Lys Leu Asp Thr Arg Leu Ala Ser Ala Glu Lys Ser Ile Ala Asp
 275                               280                               285

His Asp Thr Arg Leu Asn Gly Leu Asp Lys Thr Val Ser Asp Leu Arg
 290                               295                               300

Lys Glu Thr Arg Gln Gly Leu Ala Glu Gln Ala Ala Leu Ser Gly Leu
 305                               310                               315                               320

Phe Gln Pro Tyr Asn Val Gly
 325

```

<210> 2

<211> 644

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Inmunógeno para *Neisseria meningitidis* - proteína de fusión

<400> 2

Met	Ala	Ser	Pro	Asp	Val	Lys	Ser	Ala	Asp	Thr	Leu	Ser	Lys	Pro	Ala	1	5	10	15
Ala	Pro	Val	Val	Ser	Glu	Lys	Glu	Thr	Glu	Ala	Lys	Glu	Asp	Ala	Pro	20	25	30	
Gln	Ala	Gly	Ser	Gln	Gly	Gln	Gly	Ala	Pro	Ser	Ala	Gln	Gly	Gly	Gln	35	40	45	
Asp	Met	Ala	Ala	Val	Ser	Glu	Glu	Asn	Thr	Gly	Asn	Gly	Gly	Ala	Ala	50	55	60	
Ala	Thr	Asp	Lys	Pro	Lys	Asn	Glu	Asp	Glu	Gly	Ala	Gln	Asn	Asp	Met	65	70	75	80
Pro	Gln	Asn	Ala	Ala	Asp	Thr	Asp	Ser	Leu	Thr	Pro	Asn	His	Thr	Pro	85	90	95	
Ala	Ser	Asn	Met	Pro	Ala	Gly	Asn	Met	Glu	Asn	Gln	Ala	Pro	Asp	Ala	100	105	110	
Gly	Glu	Ser	Glu	Gln	Pro	Ala	Asn	Gln	Pro	Asp	Met	Ala	Asn	Thr	Ala	115	120	125	
Asp	Gly	Met	Gln	Gly	Asp	Asp	Pro	Ser	Ala	Gly	Gly	Glu	Asn	Ala	Gly	130	135	140	

Asn	Thr	Ala	Ala	Gln	Gly	Thr	Asn	Gln	Ala	Glu	Asn	Asn	Gln	Thr	Ala	145	150	155	160
Gly	Ser	Gln	Asn	Pro	Ala	Ser	Ser	Thr	Asn	Pro	Ser	Ala	Thr	Asn	Ser	165	170	175	
Gly	Gly	Asp	Phe	Gly	Arg	Thr	Asn	Val	Gly	Asn	Ser	Val	Val	Ile	Asp	180	185	190	
Gly	Pro	Ser	Gln	Asn	Ile	Thr	Leu	Thr	His	Cys	Lys	Gly	Asp	Ser	Cys	195	200	205	
Ser	Gly	Asn	Asn	Phe	Leu	Asp	Glu	Glu	Val	Gln	Leu	Lys	Ser	Glu	Phe	210	215	220	
Glu	Lys	Leu	Ser	Asp	Ala	Asp	Lys	Ile	Ser	Asn	Tyr	Lys	Lys	Asp	Gly	225	230	235	240
Lys	Asn	Asp	Gly	Lys	Asn	Asp	Lys	Phe	Val	Gly	Leu	Val	Ala	Asp	Ser	245	250	255	
Val	Gln	Met	Lys	Gly	Ile	Asn	Gln	Tyr	Ile	Ile	Phe	Tyr	Lys	Pro	Lys	260	265	270	
Pro	Thr	Ser	Phe	Ala	Arg	Phe	Arg	Arg	Ser	Ala	Arg	Ser	Arg	Arg	Ser	275	280	285	
Leu	Pro	Ala	Glu	Met	Pro	Leu	Ile	Pro	Val	Asn	Gln	Ala	Asp	Thr	Leu	290	295	300	
Ile	Val	Asp	Gly	Glu	Ala	Val	Ser	Leu	Thr	Gly	His	Ser	Gly	Asn	Ile	305	310	315	320
Phe	Ala	Pro	Glu	Gly	Asn	Tyr	Arg	Tyr	Leu	Thr	Tyr	Gly	Ala	Glu	Lys	325	330	335	
Leu	Pro	Gly	Gly	Ser	Tyr	Ala	Leu	Arg	Val	Gln	Gly	Glu	Pro	Ser	Lys	340	345	350	
Gly	Glu	Met	Leu	Ala	Gly	Thr	Ala	Val	Tyr	Asn	Gly	Glu	Val	Leu	His	355	360	365	
Phe	His	Thr	Glu	Asn	Gly	Arg	Pro	Ser	Pro	Ser	Arg	Gly	Arg	Phe	Ala	370	375	380	
Ala	Lys	Val	Asp	Phe	Gly	Ser	Lys	Ser	Val	Asp	Gly	Ile	Ile	Asp	Ser	385	390	395	400
Gly	Asp	Gly	Leu	His	Met	Gly	Thr	Gln	Lys	Phe	Lys	Ala	Ala	Ile	Asp	405	410	415	
Gly	Asn	Gly	Phe	Lys	Gly	Thr	Trp	Thr	Glu	Asn	Gly	Gly	Gly	Asp	Val	420	425	430	
Ser	Gly	Lys	Phe	Tyr	Gly	Pro	Ala	Gly	Glu	Glu	Val	Ala	Gly	Lys	Tyr	435	440	445	
Ser	Tyr	Arg	Pro	Thr	Asp	Ala	Glu	Lys	Gly	Gly	Phe	Gly	Val	Phe	Ala	450	455	460	
Gly	Lys	Lys	Glu	Gln	Asp	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Thr	Tyr	Lys	465	470	475	480

Val Asp Glu Tyr His Ala Asn Ala Arg Phe Ala Ile Asp His Phe Asn
485 490 495

Thr Ser Thr Asn Val Gly Gly Phe Tyr Gly Leu Thr Gly Ser Val Glu
500 505 510

Phe Asp Gln Ala Lys Arg Asp Gly Lys Ile Asp Ile Thr Ile Pro Val
515 520 525

Ala Asn Leu Gln Ser Gly Ser Gln His Phe Thr Asp His Leu Lys Ser
530 535 540

Ala Asp Ile Phe Asp Ala Ala Gln Tyr Pro Asp Ile Arg Phe Val Ser
545 550 555 560

Thr Lys Phe Asn Phe Asn Gly Lys Lys Leu Val Ser Val Asp Gly Asn
565 570 575

Leu Thr Met His Gly Lys Thr Ala Pro Val Lys Leu Lys Ala Glu Lys
580 585 590

Phe Asn Cys Tyr Gln Ser Pro Met Ala Lys Thr Glu Val Cys Gly Gly
595 600 605

Asp Phe Ser Thr Thr Ile Asp Arg Thr Lys Trp Gly Val Asp Tyr Leu
610 615 620

Val Asn Val Gly Met Thr Lys Ser Val Arg Ile Asp Ile Gln Ile Glu
625 630 635 640

Ala Ala Lys Gln

<210> 3

<211> 434

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Inmunógeno para *Neisseria meningitidis* - proteína de fusión

<400> 3

Met	Val	Ser	Ala	Val	Ile	Gly	Ser	Ala	Ala	Val	Gly	Ala	Lys	Ser	Ala
1				5					10					15	
Val	Asp	Arg	Arg	Thr	Thr	Gly	Ala	Gln	Thr	Asp	Asp	Asn	Val	Met	Ala
			20					25					30		
Leu	Arg	Ile	Glu	Thr	Thr	Ala	Arg	Ser	Tyr	Leu	Arg	Gln	Asn	Asn	Gln
		35					40					45			
Thr	Lys	Gly	Tyr	Thr	Pro	Gln	Ile	Ser	Val	Val	Gly	Tyr	Asp	Arg	His
	50					55					60				
Leu	Leu	Leu	Leu	Gly	Gln	Val	Ala	Thr	Glu	Gly	Glu	Lys	Gln	Phe	Val
65					70					75					80
Gly	Gln	Ile	Ala	Arg	Ser	Glu	Gln	Ala	Ala	Glu	Gly	Val	Tyr	Asn	Tyr
				85					90					95	
Ile	Thr	Val	Ala	Ser	Leu	Pro	Arg	Thr	Ala	Gly	Asp	Ile	Ala	Gly	Asp
			100					105					110		

Thr Trp Asn Thr Ser Lys Val Arg Ala Thr Leu Leu Gly Ile Ser Pro
 115 120 125
 Ala Thr Arg Ala Arg Val Lys Ile Val Thr Tyr Gly Asn Val Thr Tyr
 130 135 140
 Val Met Gly Ile Leu Thr Pro Glu Glu Gln Ala Gln Ile Thr Gln Lys
 145 150 155 160
 Val Ser Thr Thr Val Gly Val Gln Lys Val Ile Thr Leu Tyr Gln Asn
 165 170 175
 Tyr Val Gln Arg Gly Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly
 180 185 190
 Ala Gly Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys
 195 200 205
 Gly Leu Gln Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu Lys
 210 215 220
 Leu Lys Leu Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly Asp
 225 230 235 240
 Ser Leu Asn Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Val Ser Arg Phe Asp
 245 250 255
 Phe Ile Arg Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu Ile Thr Leu Glu Ser
 260 265 270
 Gly Glu Phe Gln Val Tyr Lys Gln Ser His Ser Ala Leu Thr Ala Phe
 275 280 285
 Gln Thr Glu Gln Ile Gln Asp Ser Glu His Ser Gly Lys Met Val Ala
 290 295 300
 Lys Arg Gln Phe Arg Ile Gly Asp Ile Ala Gly Glu His Thr Ser Phe
 305 310 315 320
 Asp Lys Leu Pro Glu Gly Gly Arg Ala Thr Tyr Arg Gly Thr Ala Phe
 325 330 335
 Gly Ser Asp Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe Ala
 340 345 350
 Ala Lys Gln Gly Asn Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Ser Pro Glu Leu
 355 360 365
 Asn Val Asp Leu Ala Ala Ala Asp Ile Lys Pro Asp Gly Lys Arg His
 370 375 380
 Ala Val Ile Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn Gln Ala Glu Lys Gly Ser
 385 390 395 400
 Tyr Ser Leu Gly Ile Phe Gly Gly Lys Ala Gln Glu Val Ala Gly Ser
 405 410 415
 Ala Glu Val Lys Thr Val Asn Gly Ile Arg His Ile Gly Leu Ala Ala
 420 425 430
 Lys Gln

5
10

<210> 4
<211> 686
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Inmunógeno para *Neisseria meningitidis* - proteína de fusión

<400> 4

Met	Val	Ser	Ala	Val	Ile	Gly	Ser	Ala	Ala	Val	Gly	Ala	Lys	Ser	Ala	1	5	10	15
Val	Asp	Arg	Arg	Thr	Thr	Gly	Ala	Gln	Thr	Asp	Asp	Asn	Val	Met	Ala	20	25	30	
Leu	Arg	Ile	Glu	Thr	Thr	Ala	Arg	Ser	Tyr	Leu	Arg	Gln	Asn	Asn	Gln	35	40	45	
Thr	Lys	Gly	Tyr	Thr	Pro	Gln	Ile	Ser	Val	Val	Gly	Tyr	Asp	Arg	His	50	55	60	
Leu	Leu	Leu	Leu	Gly	Gln	Val	Ala	Thr	Glu	Gly	Glu	Lys	Gln	Phe	Val	65	70	75	80
Gly	Gln	Ile	Ala	Arg	Ser	Glu	Gln	Ala	Ala	Glu	Gly	Val	Tyr	Asn	Tyr	85	90	95	
Ile	Thr	Val	Ala	Ser	Leu	Pro	Arg	Thr	Ala	Gly	Asp	Ile	Ala	Gly	Asp	100	105	110	
Thr	Trp	Asn	Thr	Ser	Lys	Val	Arg	Ala	Thr	Leu	Leu	Gly	Ile	Ser	Pro	115	120	125	
Ala	Thr	Arg	Ala	Arg	Val	Lys	Ile	Val	Thr	Tyr	Gly	Asn	Val	Thr	Tyr	130	135	140	
Val	Met	Gly	Ile	Leu	Thr	Pro	Glu	Glu	Gln	Ala	Gln	Ile	Thr	Gln	Lys	145	150	155	160
Val	Ser	Thr	Thr	Val	Gly	Val	Gln	Lys	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Gln	Asn	165	170	175	
Tyr	Val	Gln	Arg	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Val	Ala	Ala	Asp	Ile	Gly	180	185	190	
Ala	Gly	Leu	Ala	Asp	Ala	Leu	Thr	Ala	Pro	Leu	Asp	His	Lys	Asp	Lys	195	200	205	
Gly	Leu	Gln	Ser	Leu	Thr	Leu	Asp	Gln	Ser	Val	Arg	Lys	Asn	Glu	Lys	210	215	220	
Leu	Lys	Leu	Ala	Ala	Gln	Gly	Ala	Glu	Lys	Thr	Tyr	Gly	Asn	Gly	Asp	225	230	235	240
Ser	Leu	Asn	Thr	Gly	Lys	Leu	Lys	Asn	Asp	Lys	Val	Ser	Arg	Phe	Asp	245	250	255	
Phe	Ile	Arg	Gln	Ile	Glu	Val	Asp	Gly	Gln	Leu	Ile	Thr	Leu	Glu	Ser	260	265	270	
Gly	Glu	Phe	Gln	Val	Tyr	Lys	Gln	Ser	His	Ser	Ala	Leu	Thr	Ala	Phe	275	280	285	

Gln Thr Glu Gln Ile Gln Asp Ser Glu His Ser Gly Lys Met Val Ala
 290 295 300
 Lys Arg Gln Phe Arg Ile Gly Asp Leu Gly Gly Glu His Thr Ala Phe
 305 310 315 320
 Asn Gln Leu Pro Asp Gly Lys Ala Glu Tyr Arg Gly Thr Ala Phe Gly
 325 330 335
 Ser Asp Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe Thr Lys
 340 345 350
 Lys Gln Gly Asn Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Ser Pro Glu Leu Asn
 355 360 365
 Val Glu Leu Ala Ser Ala Glu Ile Lys Ala Asp Gly Lys Ser His Ala
 370 375 380
 Val Ile Leu Gly Asp Val Arg Tyr Gly Ser Glu Glu Lys Gly Ser Tyr
 385 390 395 400
 Ser Leu Gly Ile Phe Gly Gly Arg Ala Gln Glu Val Ala Gly Ser Ala
 405 410 415
 Glu Val Lys Thr Val Asn Gly Ile Arg His Ile Gly Leu Ala Ala Lys
 420 425 430
 Gln Gly Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu
 435 440 445
 Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys Gly Leu Gln
 450 455 460
 Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu
 465 470 475 480
 Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn
 485 490 495
 Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Val Ser Arg Phe Asp Phe Ile Arg
 500 505 510
 Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe
 515 520 525
 Gln Val Tyr Lys Gln Ser His Ser Ala Leu Thr Ala Phe Gln Thr Glu
 530 535 540
 Gln Ile Gln Asp Ser Glu His Ser Gly Lys Met Val Ala Lys Arg Gln
 545 550 555 560
 Phe Arg Ile Gly Asp Leu Gly Gly Glu His Thr Ala Phe Asn Gln Leu
 565 570 575
 Pro Asp Gly Lys Ala Glu Tyr Arg Gly Thr Ala Phe Gly Ser Asp Asp
 580 585 590
 Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe Thr Lys Lys Gln Gly
 595 600 605
 Asn Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Ser Pro Glu Leu Asn Val Glu Leu
 610 615 620

Ala	Ser	Ala	Glu	Ile	Lys	Ala	Asp	Gly	Lys	Ser	His	Ala	Val	Ile	Leu
625					630					635					640
Gly	Asp	Val	Arg	Tyr	Gly	Ser	Glu	Glu	Lys	Gly	Ser	Tyr	Ser	Leu	Gly
				645					650					655	
Ile	Phe	Gly	Gly	Arg	Ala	Gln	Glu	Val	Ala	Gly	Ser	Ala	Glu	Val	Lys
			660					665					670		
Thr	Val	Asn	Gly	Ile	Arg	His	Ile	Gly	Leu	Ala	Ala	Lys	Gln		
		675					680					685			

<210> 5

<211> 776

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Inmunógeno para *Neisseria meningitidis* - proteína de fusión

<400> 5

Met	Gly	Pro	Asp	Ser	Asp	Arg	Leu	Gln	Gln	Arg	Arg	Val	Ala	Ala	Asp	1	5	10	15
Ile	Gly	Ala	Gly	Leu	Ala	Asp	Ala	Leu	Thr	Ala	Pro	Leu	Asp	His	Lys	20	25	30	
Asp	Lys	Ser	Leu	Gln	Ser	Leu	Thr	Leu	Asp	Gln	Ser	Val	Arg	Lys	Asn	35	40	45	
Glu	Lys	Leu	Lys	Leu	Ala	Ala	Gln	Gly	Ala	Glu	Lys	Thr	Tyr	Gly	Asn	50	55	60	
Gly	Asp	Ser	Leu	Asn	Thr	Gly	Lys	Leu	Lys	Asn	Asp	Lys	Val	Ser	Arg	65	70	75	80
Phe	Asp	Phe	Ile	Arg	Gln	Ile	Glu	Val	Asp	Gly	Gln	Leu	Ile	Thr	Leu	85	90	95	
Glu	Ser	Gly	Glu	Phe	Gln	Ile	Tyr	Lys	Gln	Asp	His	Ser	Ala	Val	Val	100	105	110	
Ala	Leu	Gln	Ile	Glu	Lys	Ile	Asn	Asn	Pro	Asp	Lys	Ile	Asp	Ser	Leu	115	120	125	
Ile	Asn	Gln	Arg	Ser	Phe	Leu	Val	Ser	Gly	Leu	Gly	Gly	Glu	His	Thr	130	135	140	
Ala	Phe	Asn	Gln	Leu	Pro	Asp	Gly	Lys	Ala	Glu	Tyr	His	Gly	Lys	Ala	145	150	155	160
Phe	Ser	Ser	Asp	Asp	Ala	Gly	Gly	Lys	Leu	Thr	Tyr	Thr	Ile	Asp	Phe	165	170	175	
Ala	Ala	Lys	Gln	Gly	His	Gly	Lys	Ile	Glu	His	Leu	Lys	Thr	Pro	Glu	180	185	190	
Gln	Asn	Val	Glu	Leu	Ala	Ala	Ala	Glu	Leu	Lys	Ala	Asp	Glu	Lys	Ser	195	200	205	
His	Ala	Val	Ile	Leu	Gly	Asp	Thr	Arg	Tyr	Gly	Ser	Glu	Glu	Lys	Gly	210	215	220	

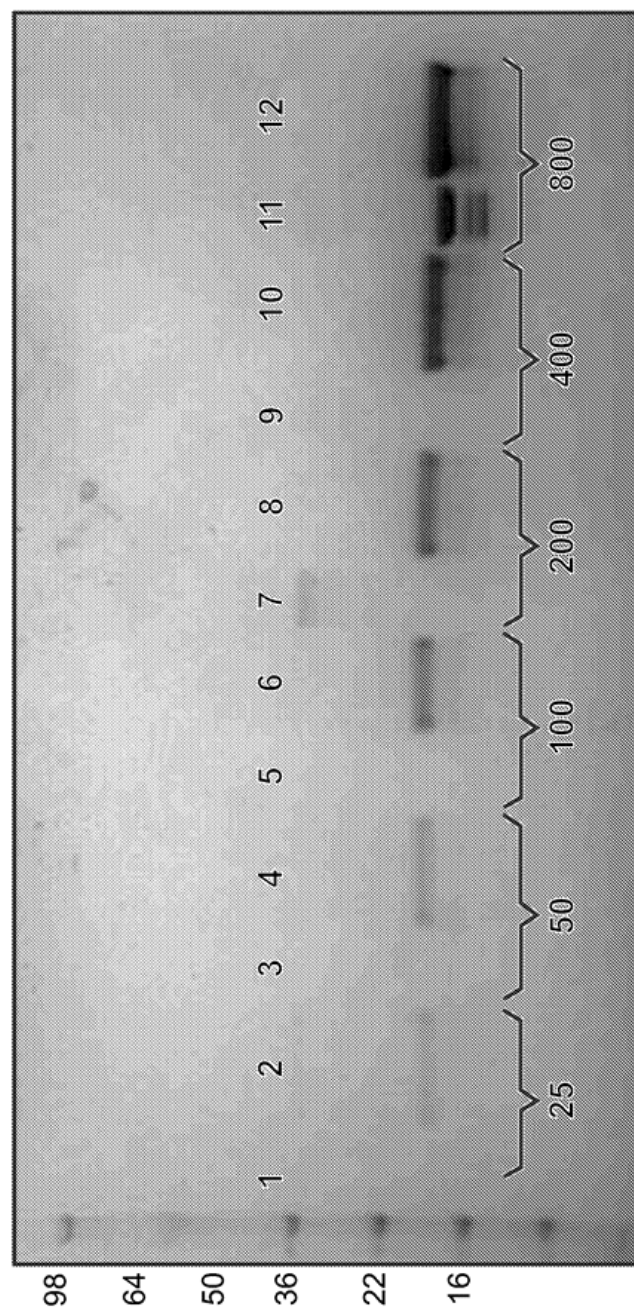
Thr Tyr His Leu Ala Leu Phe Gly Asp Arg Ala Gln Glu Ile Ala Gly
 225 230 235 240
 Ser Ala Thr Val Lys Ile Gly Glu Lys Val His Glu Ile Gly Ile Ala
 245 250 255
 Gly Lys Gln Gly Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala
 260 265 270
 Gly Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys Gly
 275 280 285
 Leu Gln Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu
 290 295 300
 Lys Leu Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser
 305 310 315 320
 Leu Asn Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Val Ser Arg Phe Asp Phe
 325 330 335
 Ile Arg Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu Ile Thr Leu Glu Ser Gly
 340 345 350
 Glu Phe Gln Val Tyr Lys Gln Ser His Ser Ala Leu Thr Ala Phe Gln
 355 360 365
 Thr Glu Gln Ile Gln Asp Ser Glu His Ser Gly Lys Met Val Ala Lys
 370 375 380
 Arg Gln Phe Arg Ile Gly Asp Ile Ala Gly Glu His Thr Ser Phe Asp
 385 390 395 400
 Lys Leu Pro Glu Gly Gly Arg Ala Thr Tyr Arg Gly Thr Ala Phe Gly
 405 410 415
 Ser Asp Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala
 420 425 430
 Lys Gln Gly Asn Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Ser Pro Glu Leu Asn
 435 440 445
 Val Asp Leu Ala Ala Ala Asp Ile Lys Pro Asp Gly Lys Arg His Ala
 450 455 460
 Val Ile Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn Gln Ala Glu Lys Gly Ser Tyr
 465 470 475 480
 Ser Leu Gly Ile Phe Gly Gly Lys Ala Gln Glu Val Ala Gly Ser Ala
 485 490 495
 Glu Val Lys Thr Val Asn Gly Ile Arg His Ile Gly Leu Ala Ala Lys
 500 505 510
 Gln Gly Ser Gly Pro Asp Ser Asp Arg Leu Gln Gln Arg Arg Val Ala
 515 520 525
 Ala Asp Ile Gly Thr Gly Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp
 530 535 540
 His Lys Asp Lys Gly Leu Lys Ser Leu Thr Leu Glu Asp Ser Ile Pro
 545 550 555 560

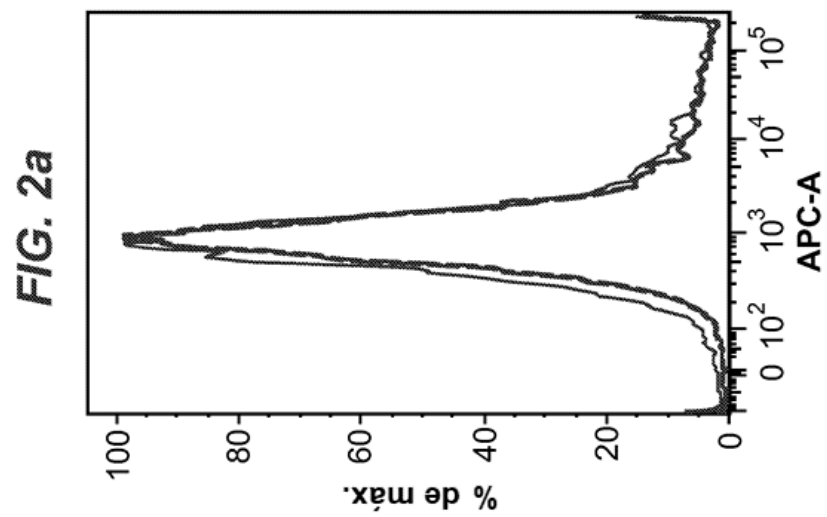
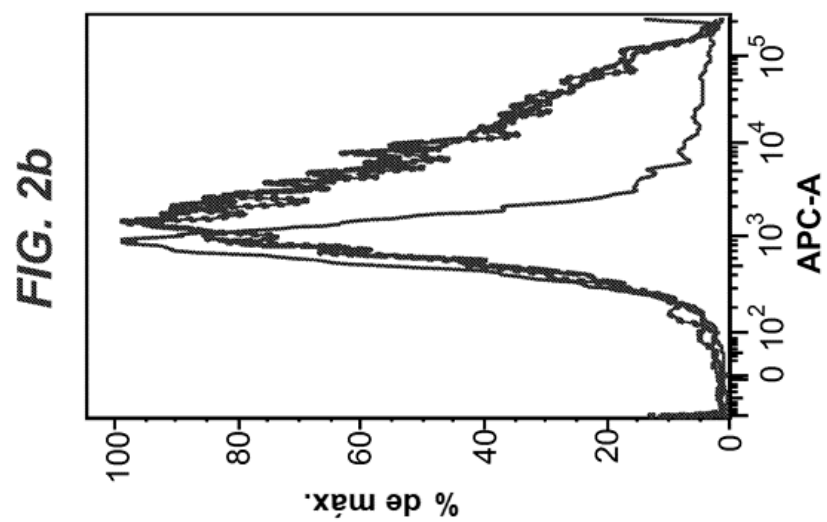
Gln Asn Gly Thr Leu Thr Leu Ser Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Phe
 565 570 575
 Lys Ala Gly Asp Lys Asp Asn Ser Leu Asn Thr Gly Lys Leu Lys Asn
 580 585 590
 Asp Lys Ile Ser Arg Phe Asp Phe Val Gln Lys Ile Glu Val Asp Gly
 595 600 605
 Gln Thr Ile Thr Leu Ala Ser Gly Glu Phe Gln Ile Tyr Lys Gln Asn
 610 615 620
 His Ser Ala Val Val Ala Leu Gln Ile Glu Lys Ile Asn Asn Pro Asp
 625 630 635 640
 Lys Thr Asp Ser Leu Ile Asn Gln Arg Ser Phe Leu Val Ser Gly Leu
 645 650 655
 Gly Gly Glu His Thr Ala Phe Asn Gln Leu Pro Gly Gly Lys Ala Glu
 660 665 670
 Tyr His Gly Lys Ala Phe Ser Ser Asp Asp Pro Asn Gly Arg Leu His
 675 680 685
 Tyr Ser Ile Asp Phe Thr Lys Lys Gln Gly Tyr Gly Arg Ile Glu His
 690 695 700
 Leu Lys Thr Leu Glu Gln Asn Val Glu Leu Ala Ala Ala Glu Leu Lys
 705 710 715 720
 Ala Asp Glu Lys Ser His Ala Val Ile Leu Gly Asp Thr Arg Tyr Gly
 725 730 735
 Ser Glu Glu Lys Gly Thr Tyr His Leu Ala Leu Phe Gly Asp Arg Ala
 740 745 750
 Gln Glu Ile Ala Gly Ser Ala Thr Val Lys Ile Gly Glu Lys Val His
 755 760 765
 Glu Ile Gly Ile Ala Gly Lys Gln
 770 775

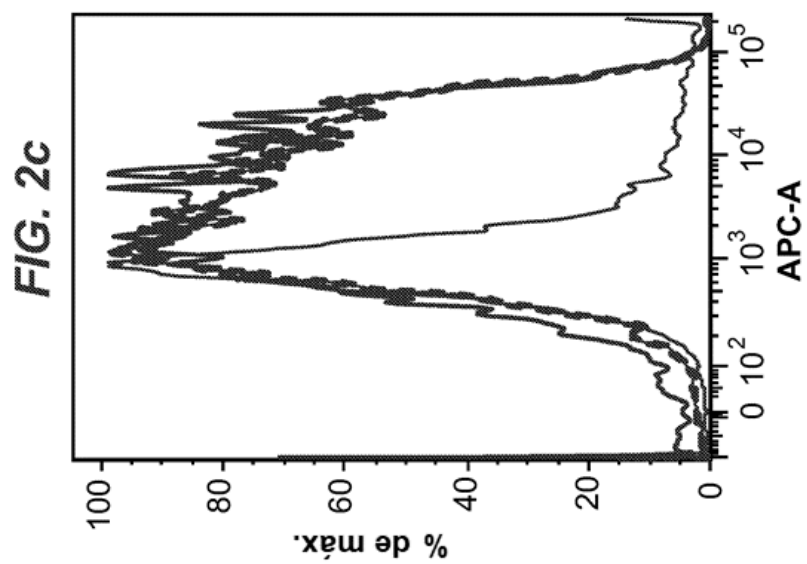
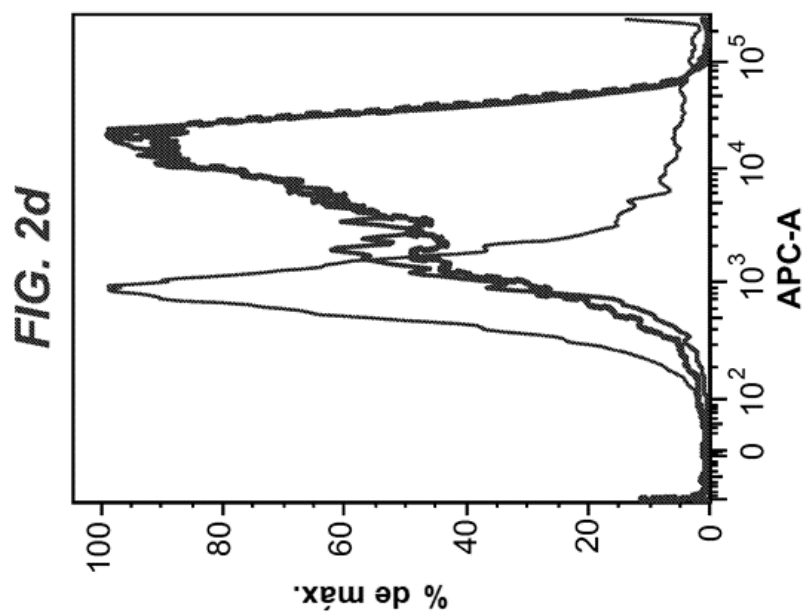
REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para analizar un componente que está adsorbido en una sal metálica insoluble, que comprende las etapas de: (i) marcar el componente adsorbido con un reactivo de unión para producir un componente adsorbido marcado; y (ii) analizar el componente adsorbido marcado mediante citometría de flujo.
- 5 2. El procedimiento según la reivindicación 1 que comprende además, antes del análisis, la etapa de adsorber un componente en una sal metálica insoluble.
3. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que la etapa de marcado está precedida por una etapa de bloqueo.
4. El procedimiento de la reivindicación anterior, en el que el componente es un antígeno polipeptídico.
- 10 5. El procedimiento de la reivindicación anterior, en el que el componente es un inmunopotenciador.
6. El procedimiento de la reivindicación anterior, en el que la sal metálica es una sal de aluminio.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la sal de aluminio comprende un hidróxido de aluminio y/o un fosfato de aluminio.
8. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que el reactivo de unión comprende un anticuerpo.
- 15 9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el reactivo de unión comprende un anticuerpo primario y un anticuerpo secundario.
10. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que el reactivo de unión incluye un fluoróforo.
- 20 11. Un procedimiento de fabricación de una composición que comprende una etapa de análisis de un componente adsorbido, utilizando el procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que se analiza una muestra de un lote grande de un componente adsorbido de una sal metálica insoluble y en el que se decide proceder con la fabricación de una composición que incorpora el lote evaluado del componente adsorbido sobre la base de los resultados del análisis de citometría de flujo.
- 25 12. Un procedimiento de distribución de una composición que comprende una etapa de control de calidad de análisis de un componente adsorbido utilizando el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 o el procedimiento de la reivindicación 11, en el que los resultados del análisis del componente adsorbido en la sal metálica insoluble determinan si se realizan etapas posteriores en el procedimiento de distribución.
- 30 13. El procedimiento de distribución de una composición de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la determinación de si se lleva a cabo una etapa posterior con un lote de la composición se realiza sobre la base de los resultados del análisis de citometría de flujo del lote de componente adsorbido, opcionalmente, en el que la etapa posterior es envasar una dosis unitaria de la suspensión de componente adsorbido sobre una sal metálica insoluble.

FIG. 1







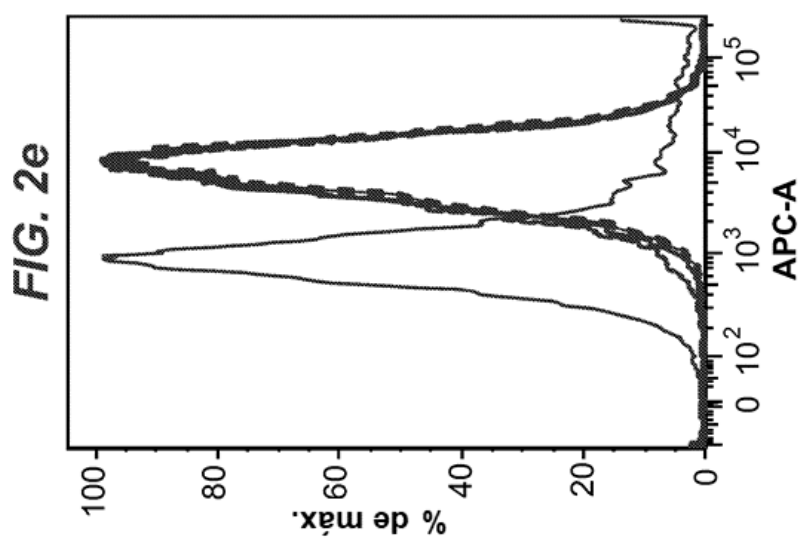
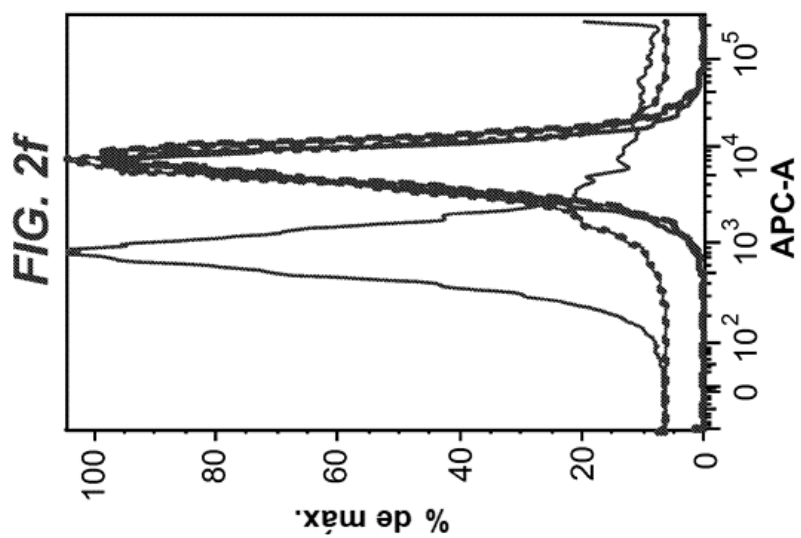


FIG. 2g

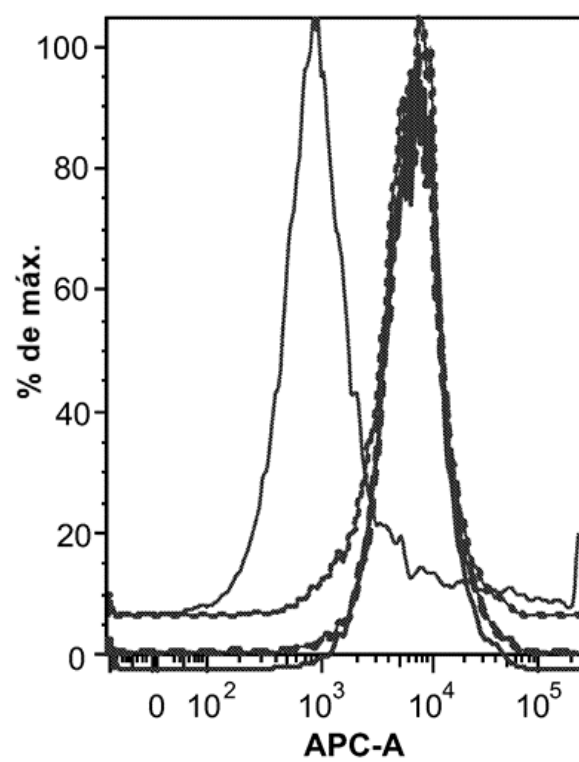


FIG. 3b

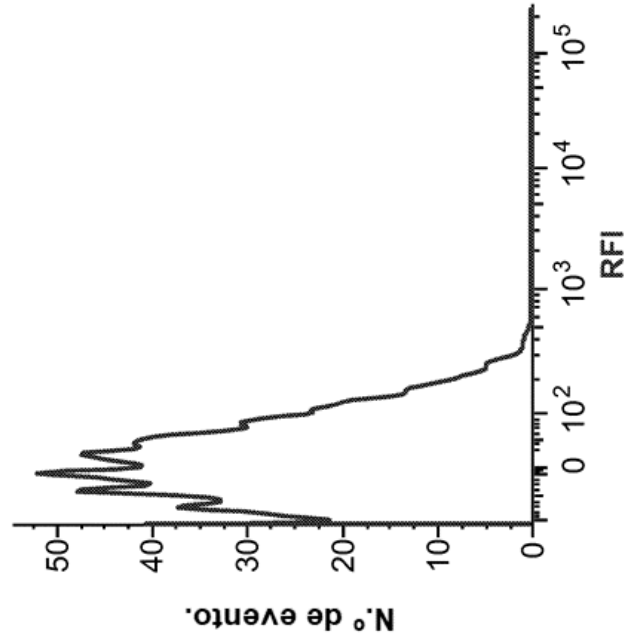


FIG. 3a

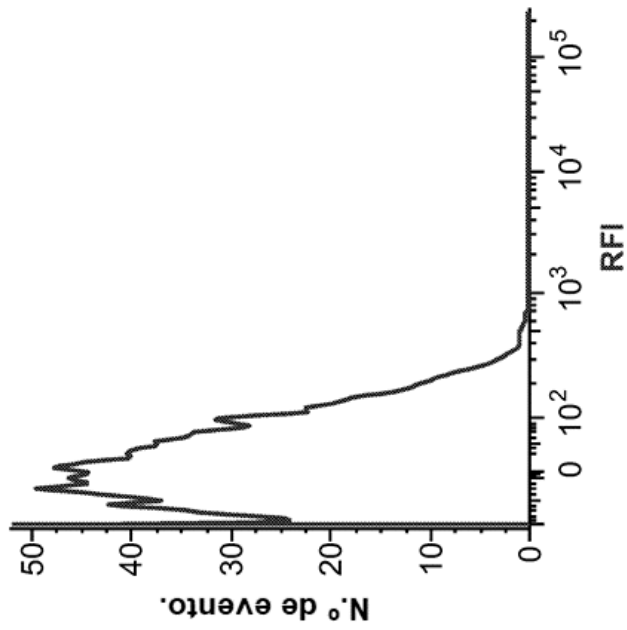


FIG. 3d

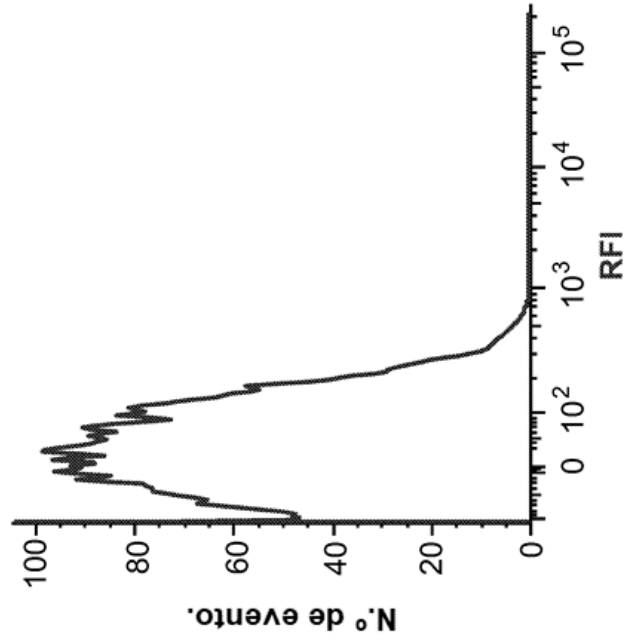
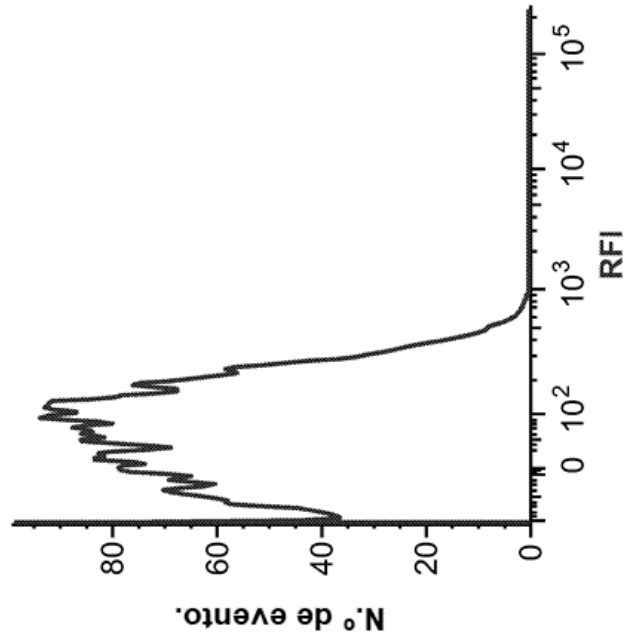
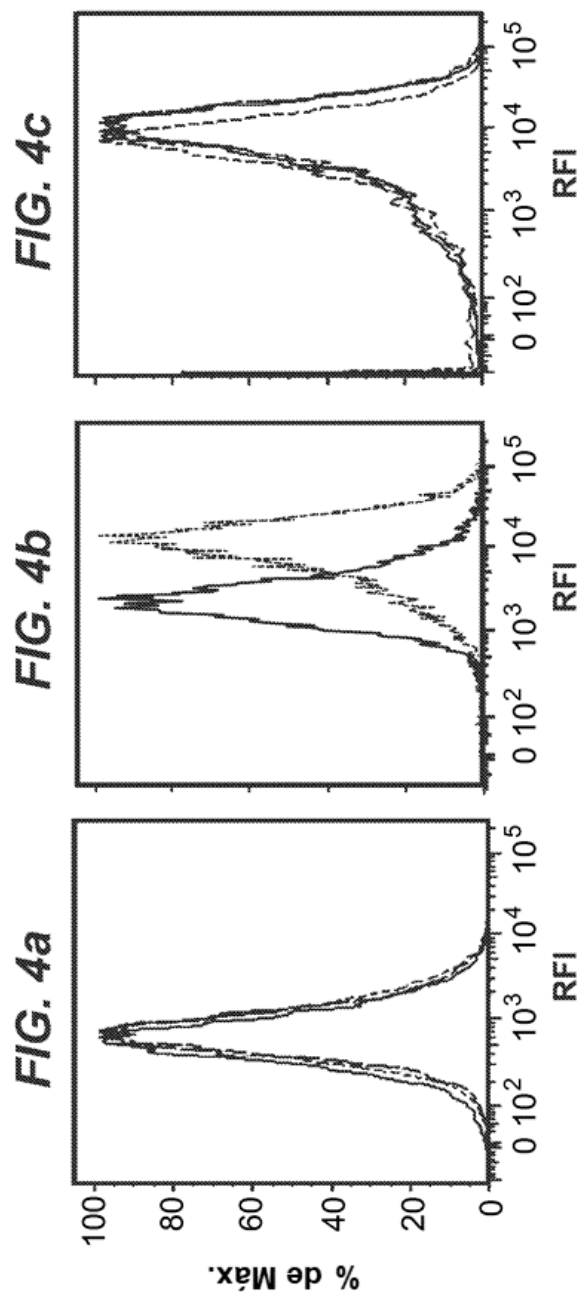
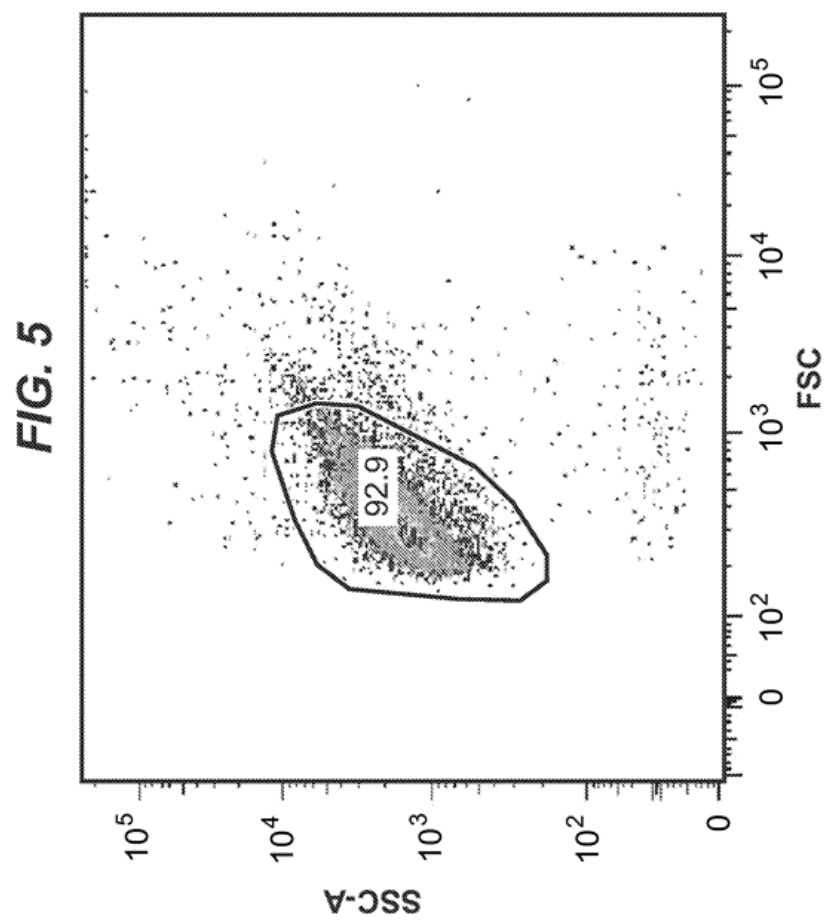
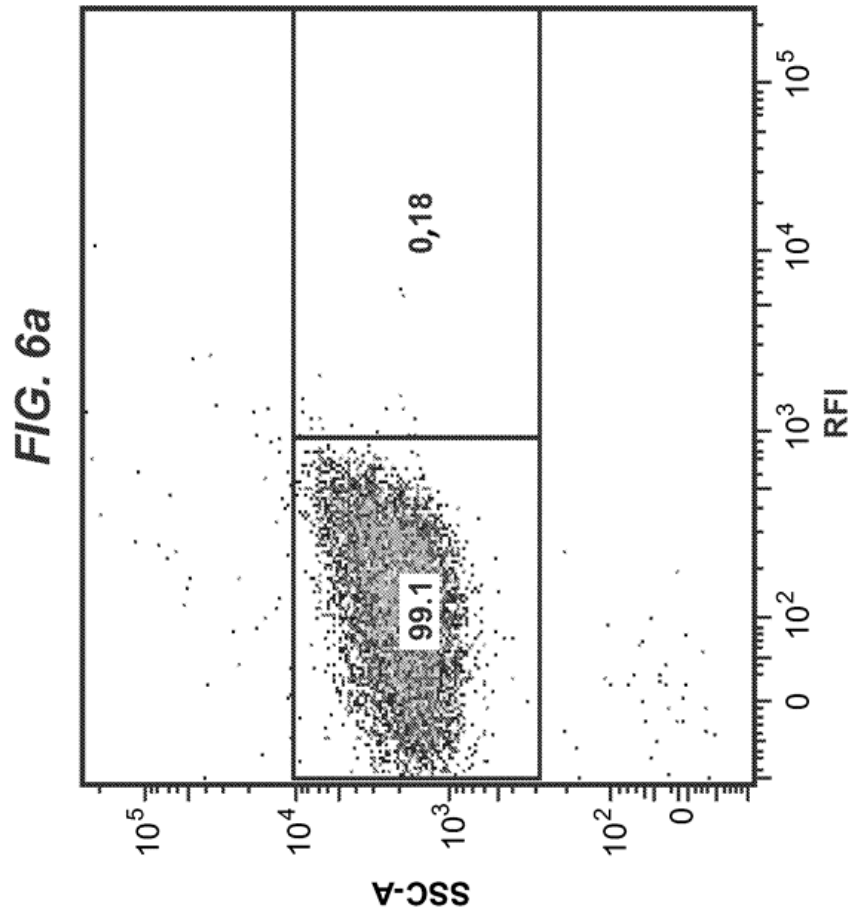


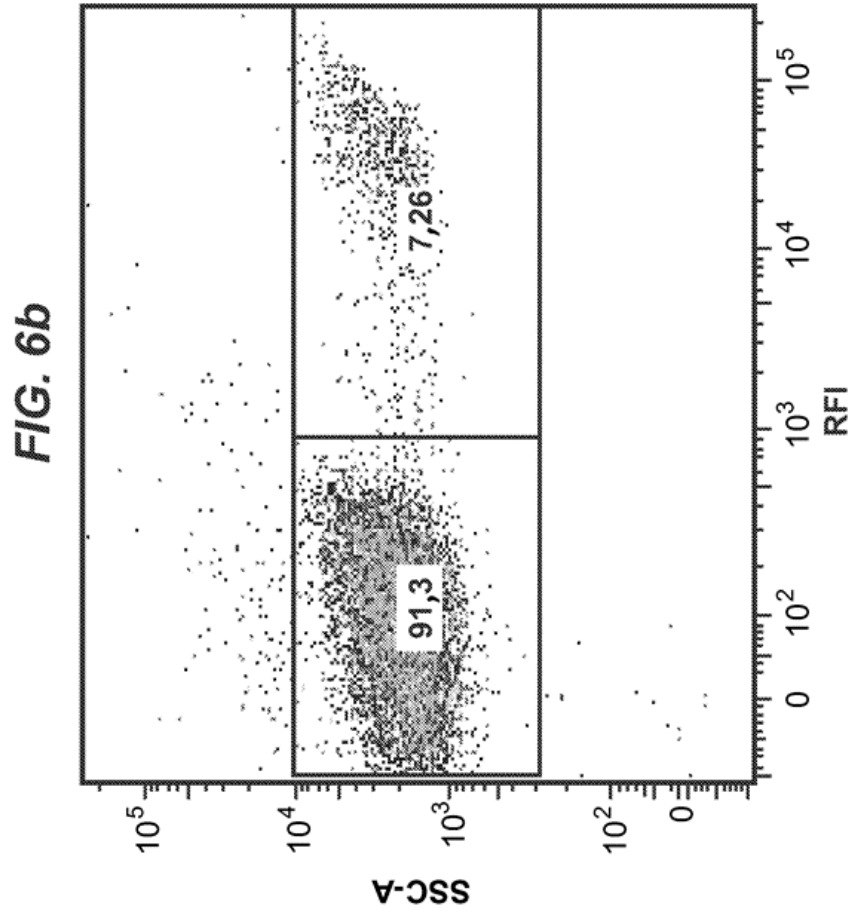
FIG. 3c

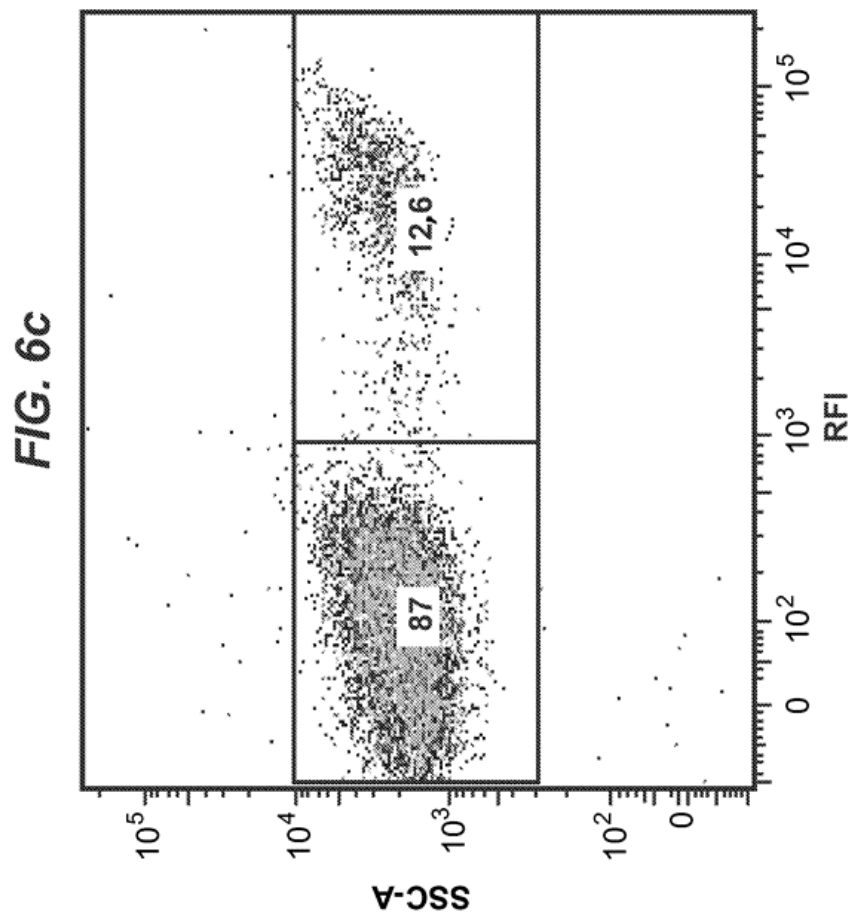


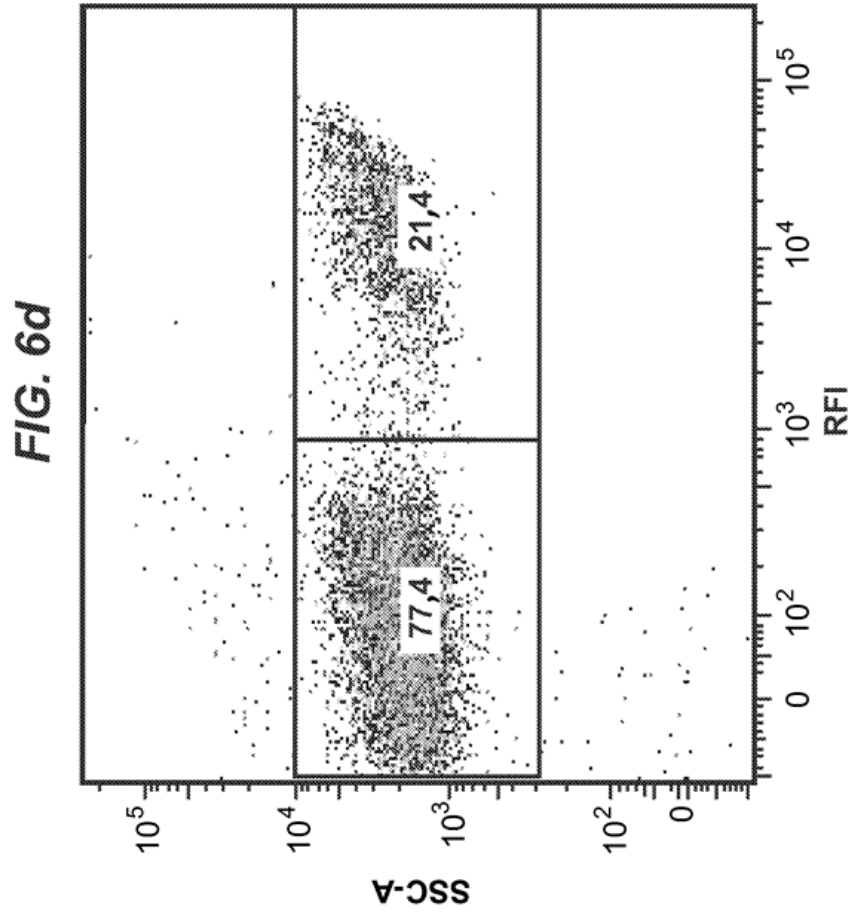












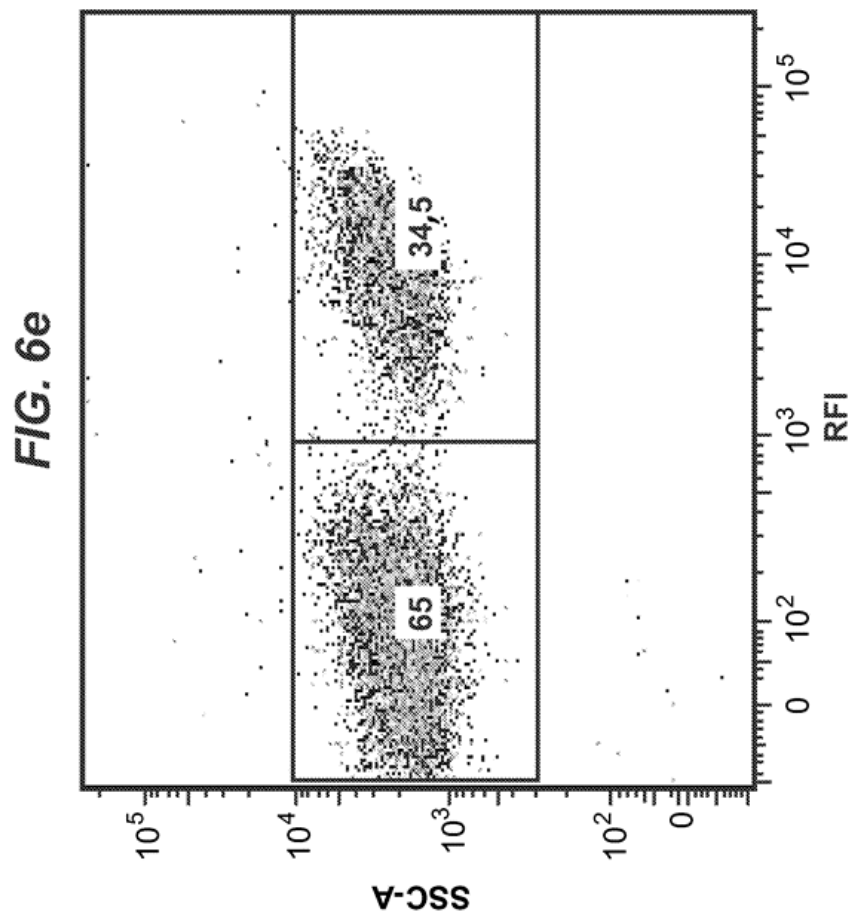
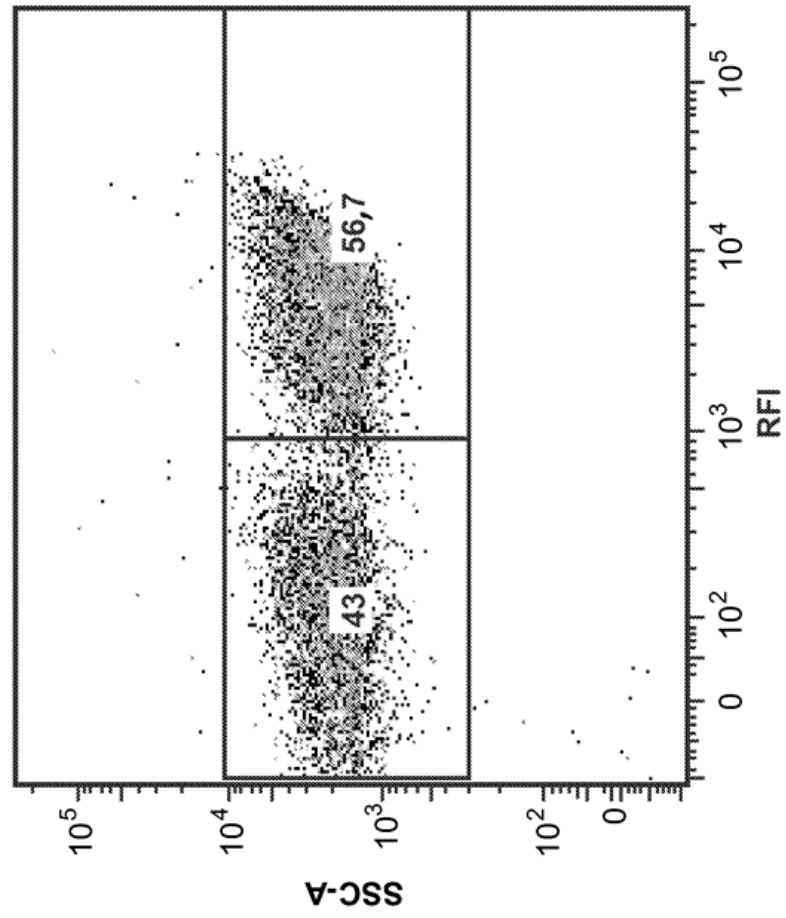


FIG. 6f



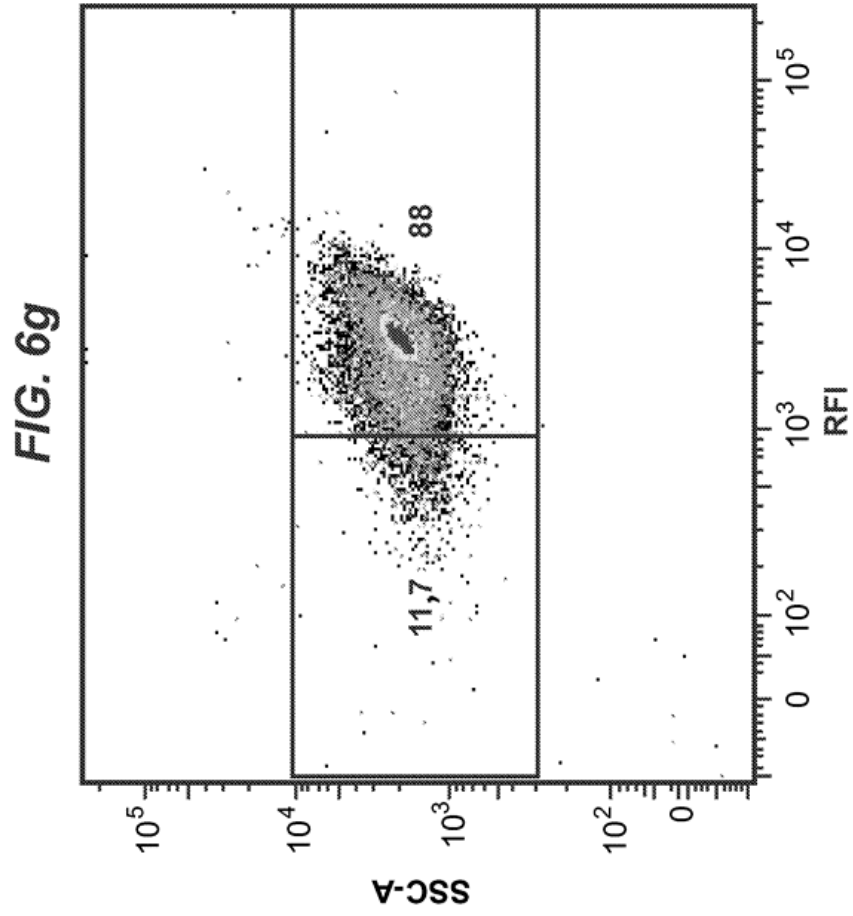
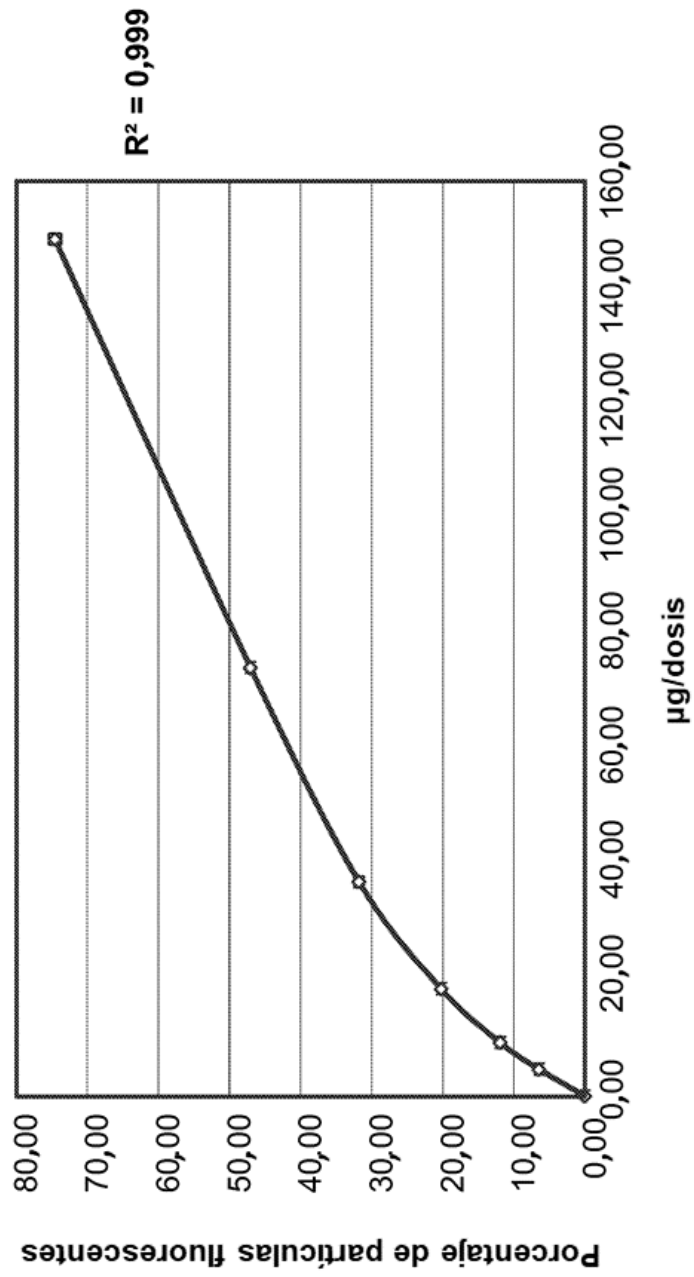
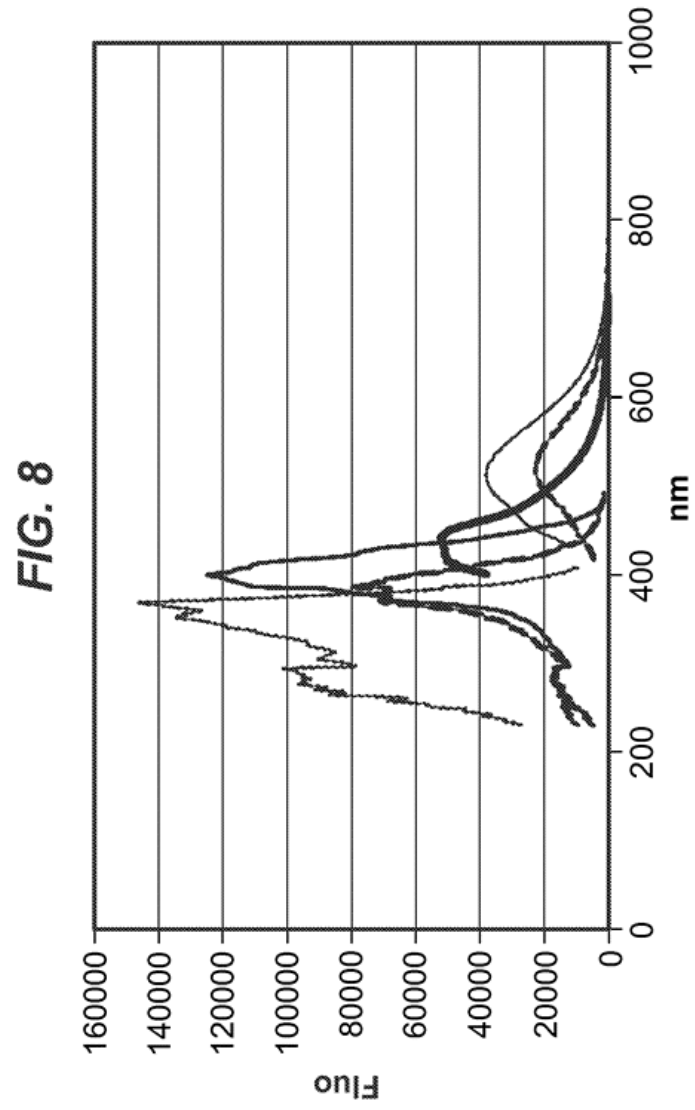
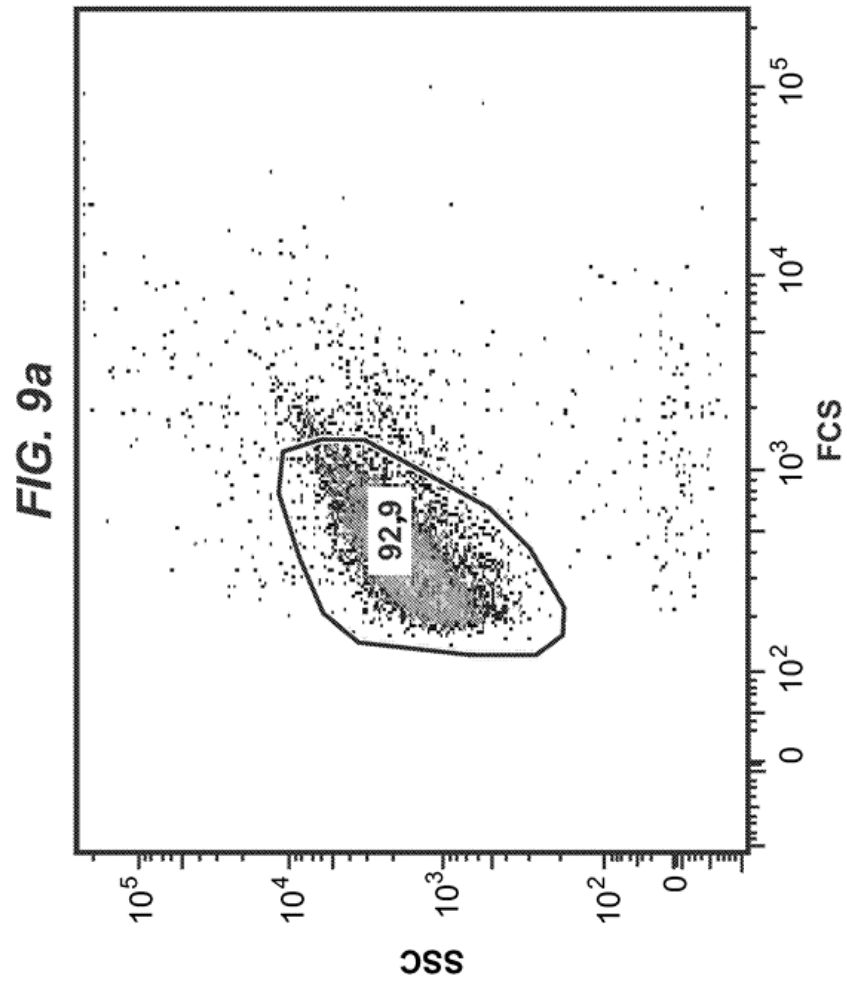


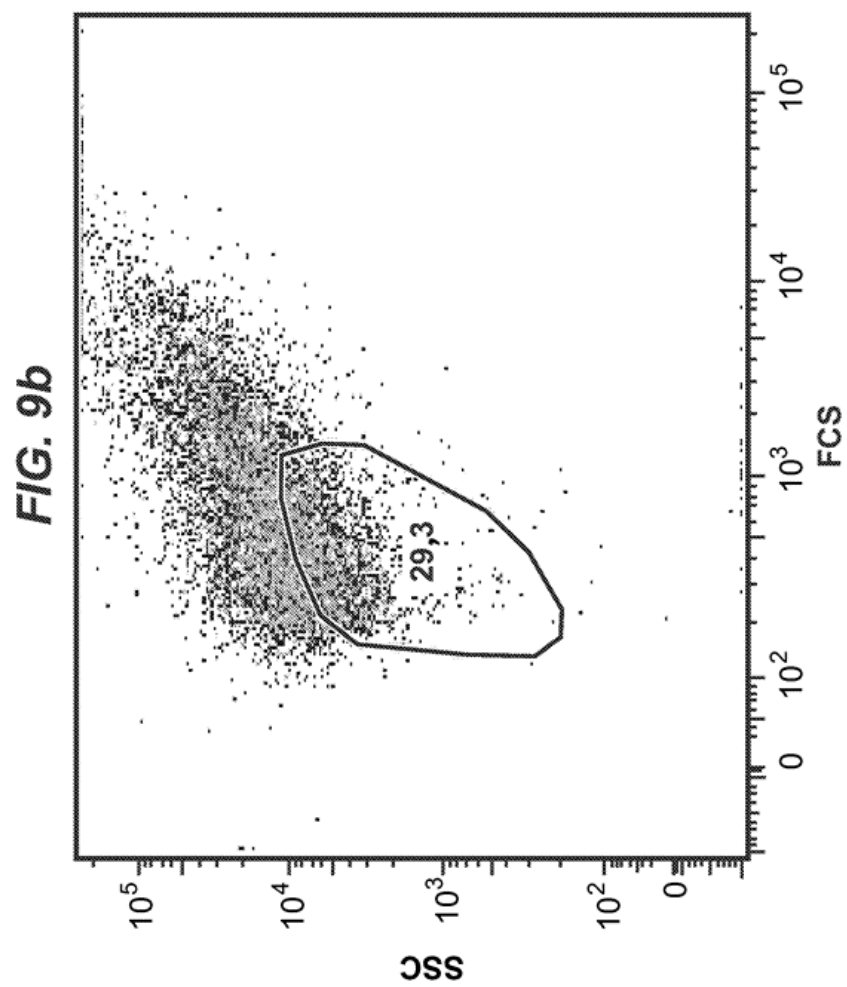
FIG. 7

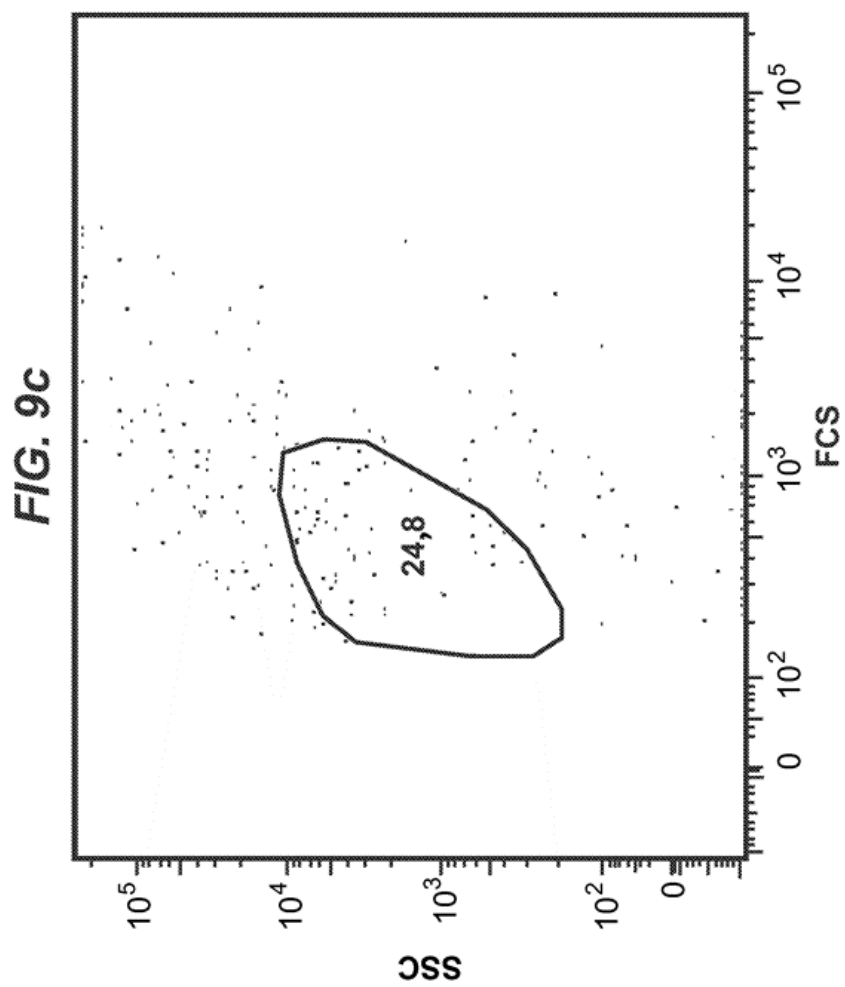
Ensayo FC

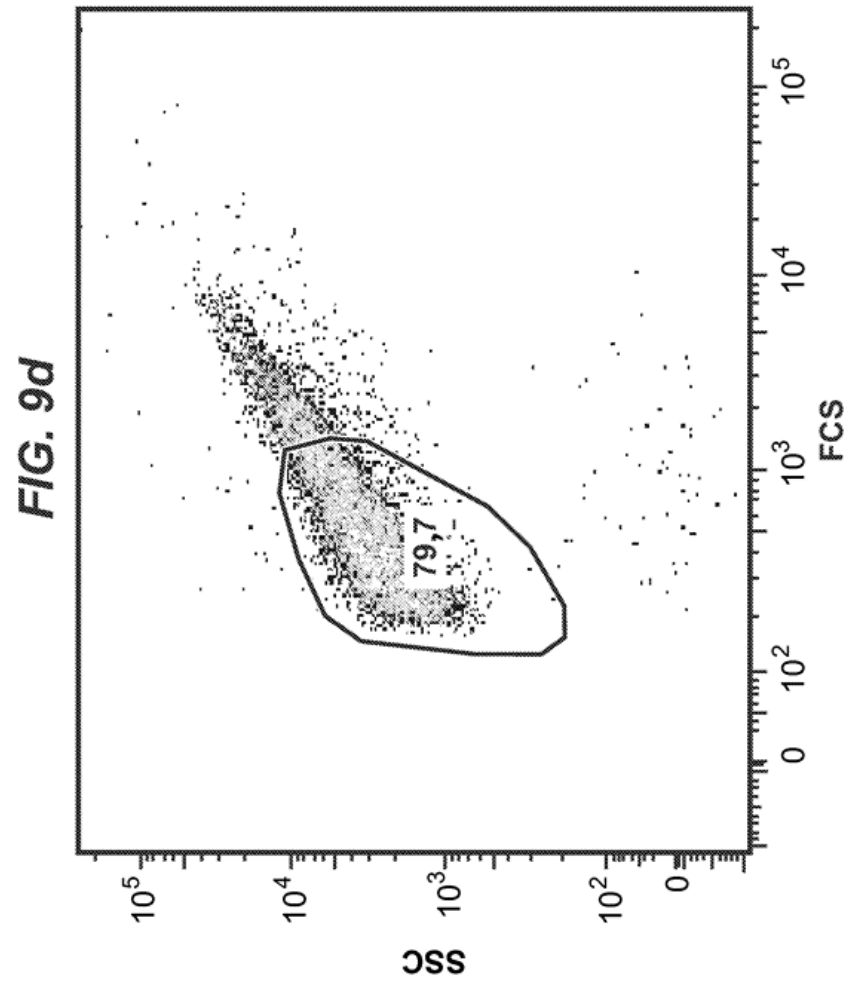


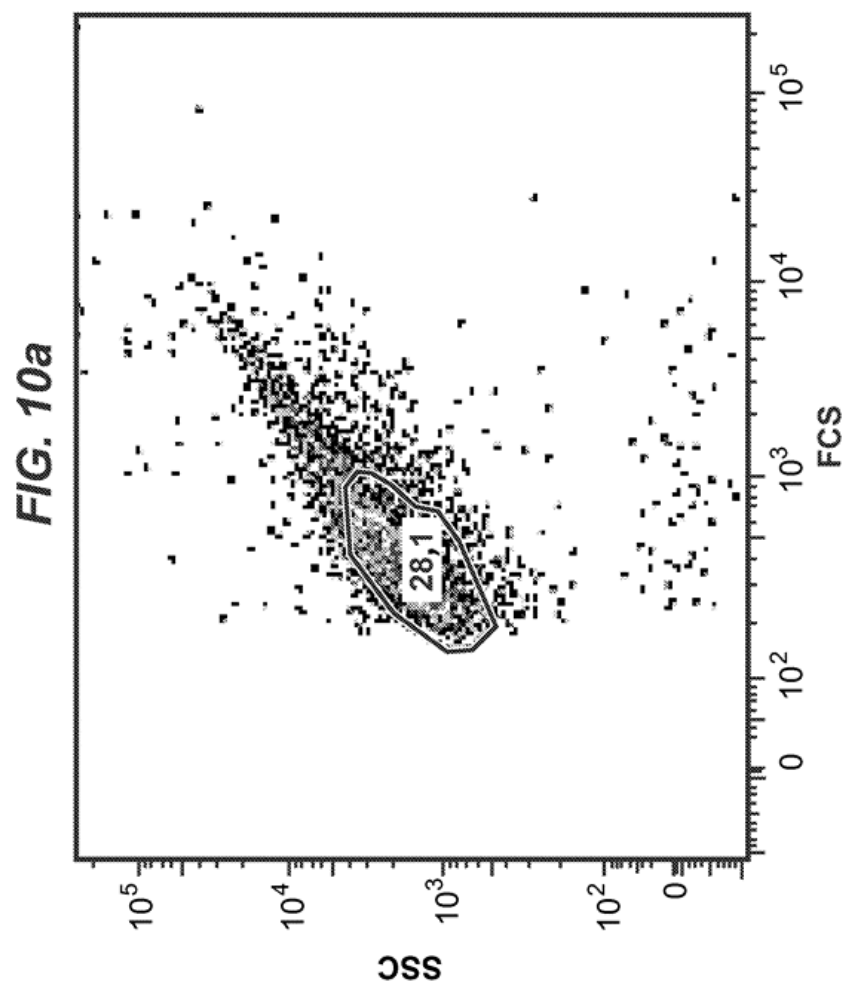


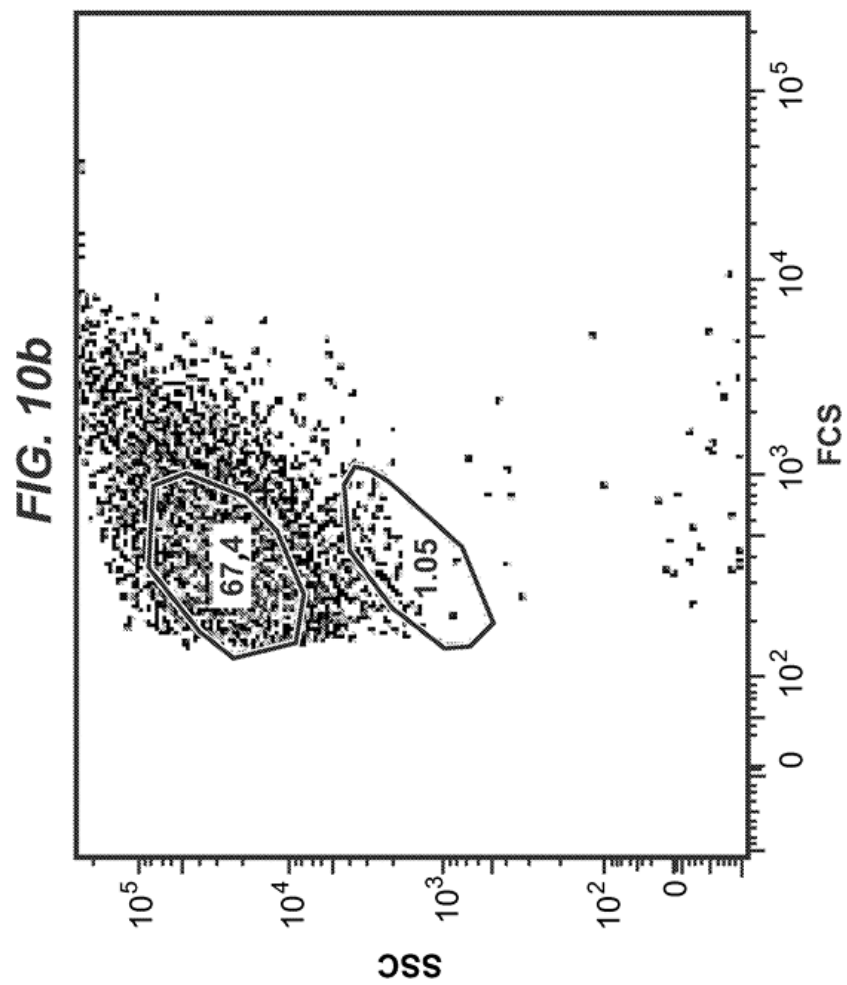












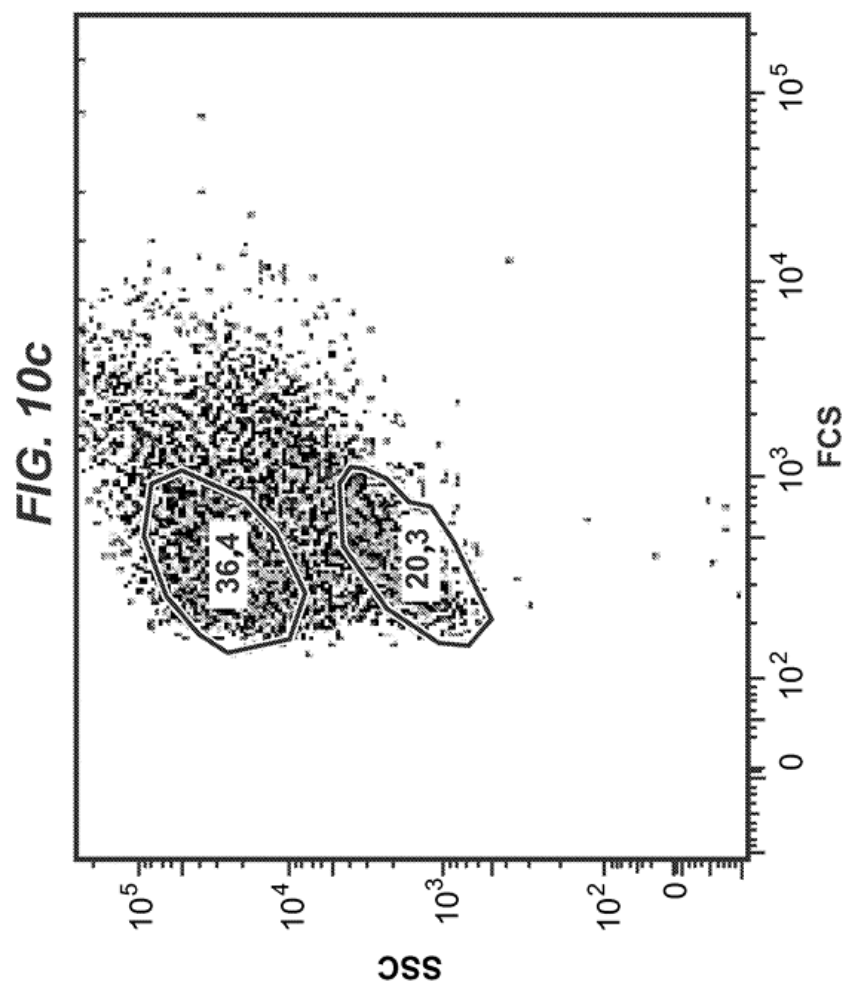


FIG. 11a

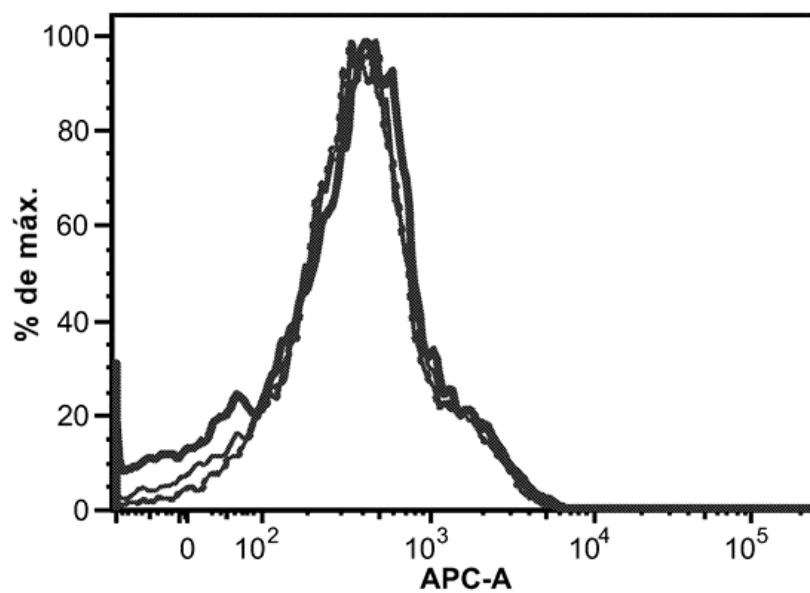


FIG. 11b

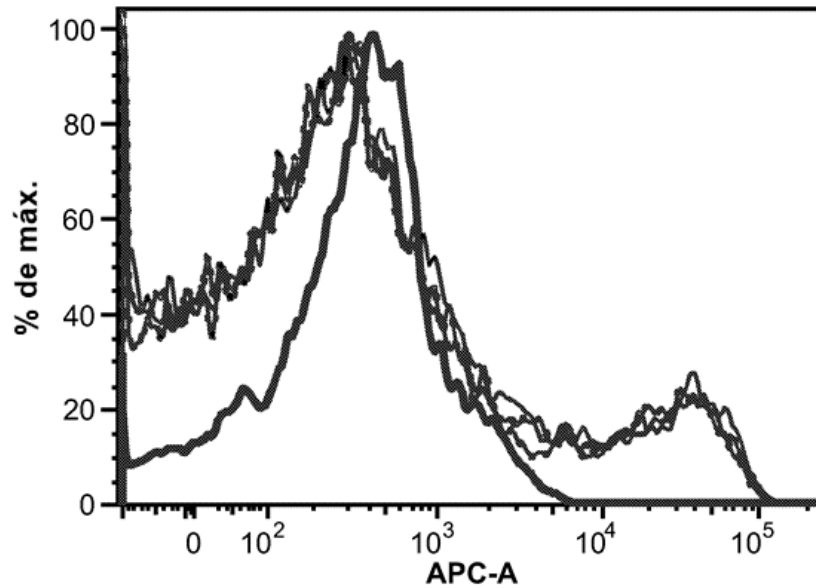


FIG. 11c

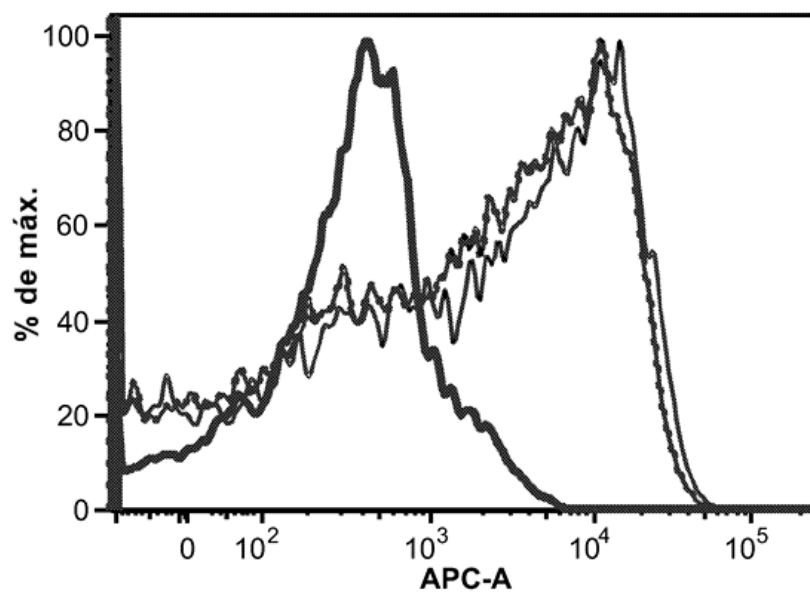


FIG. 11d

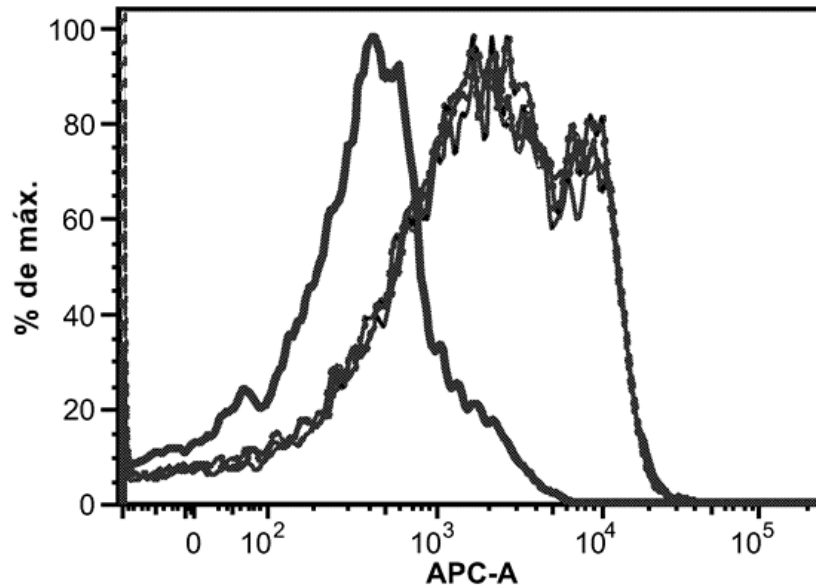


FIG. 11e

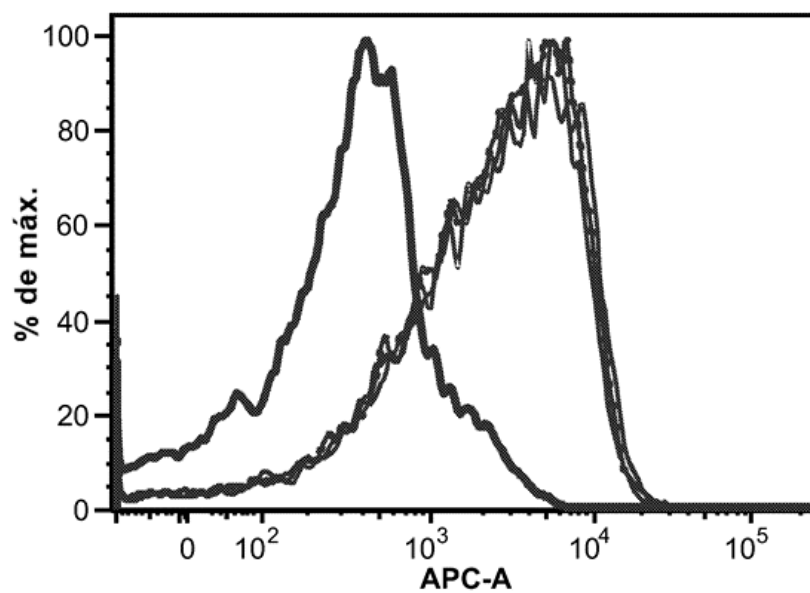


FIG. 11f

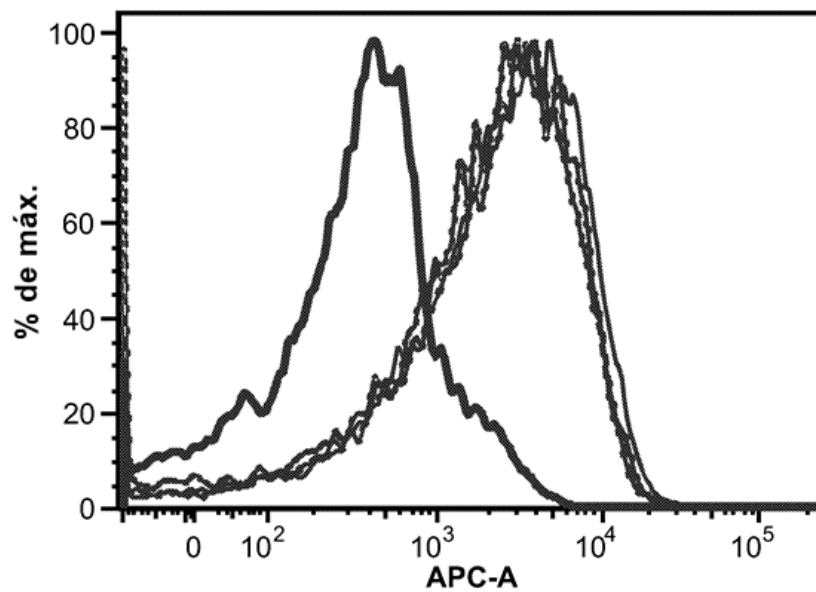


FIG. 11g

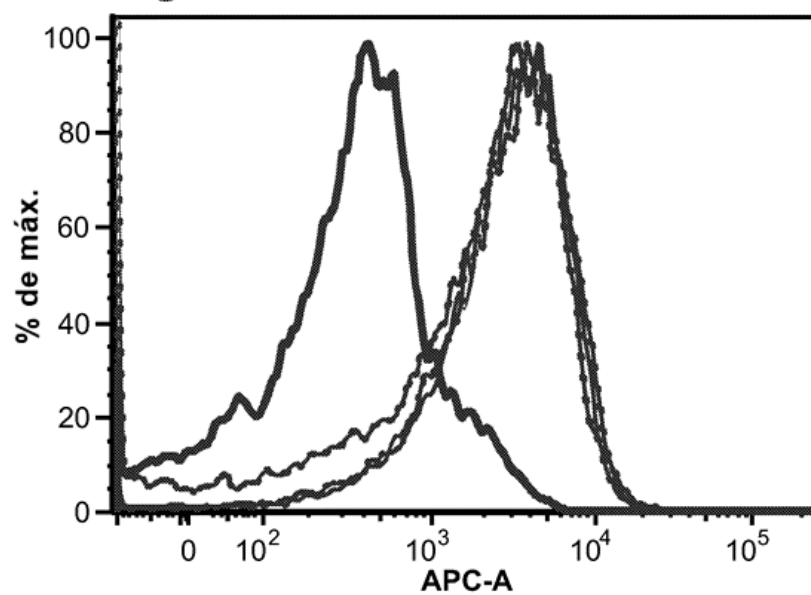


FIG. 11h

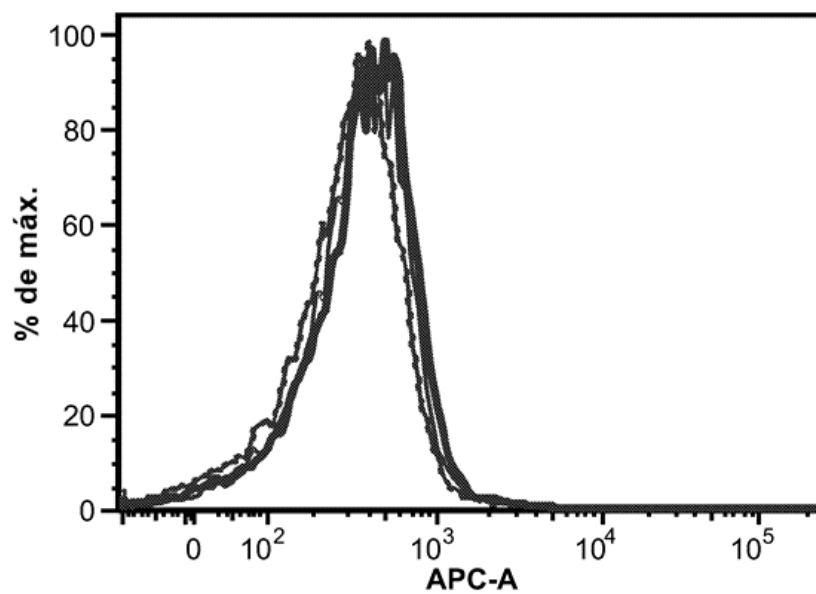


FIG. 11i

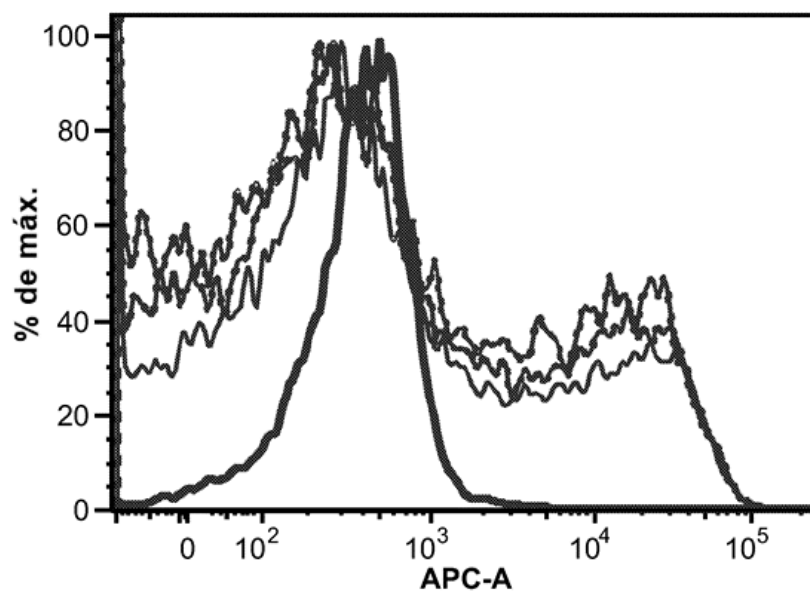


FIG. 11j

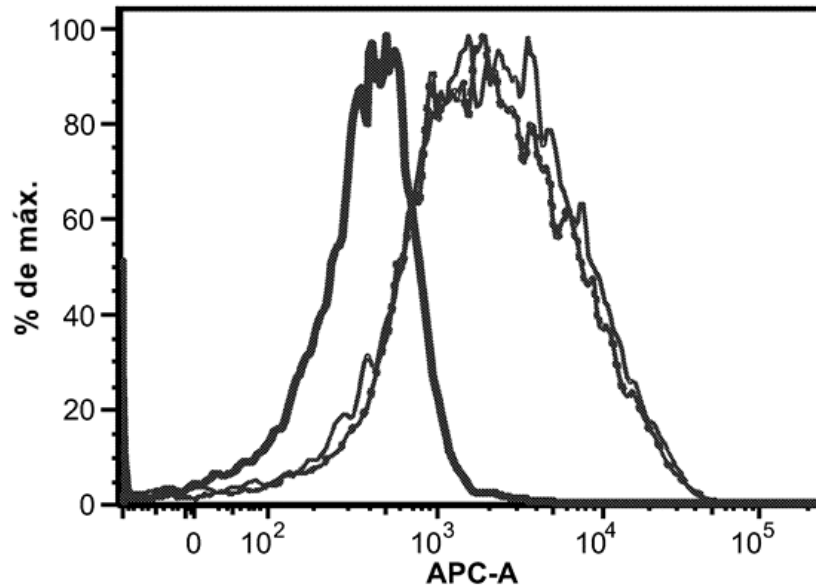


FIG. 11k

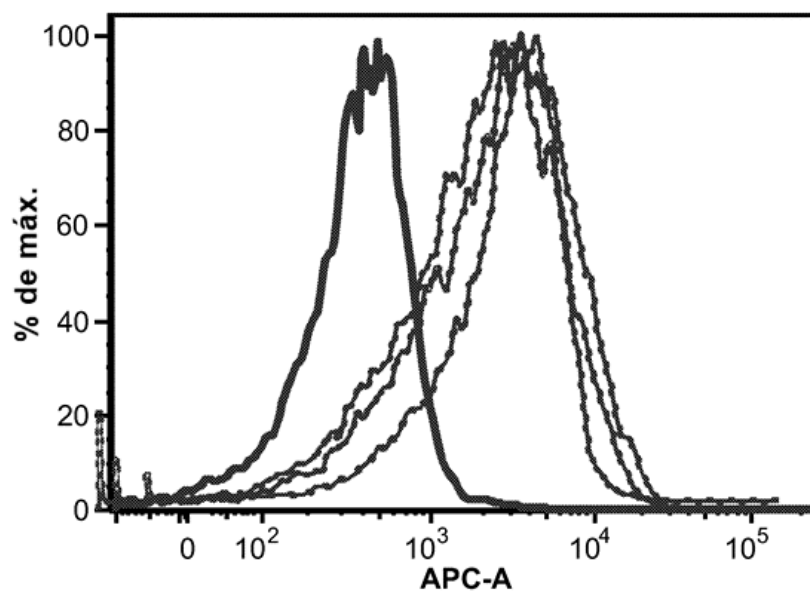


FIG. 11l

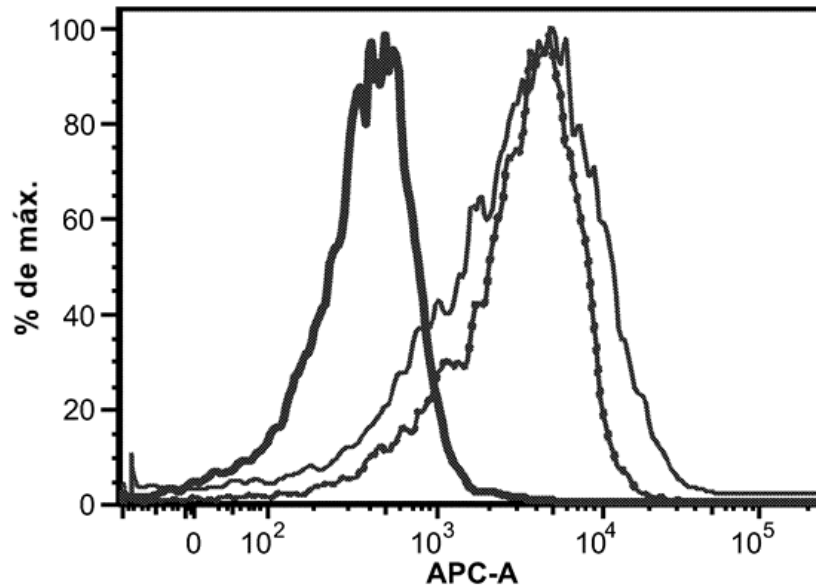


FIG. 11m

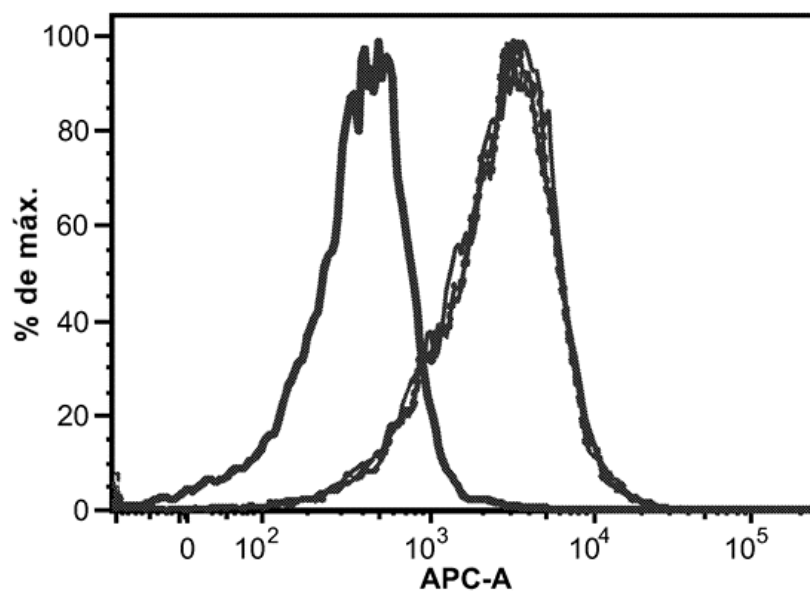


FIG. 11n

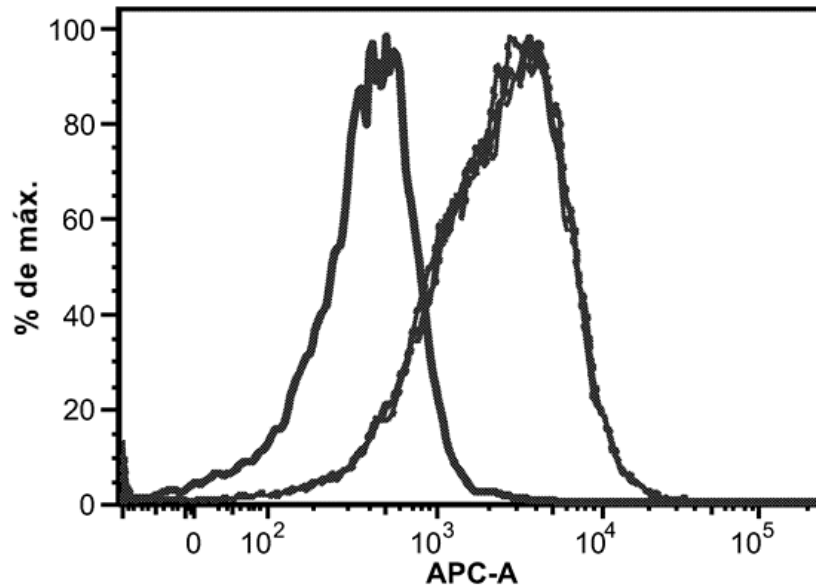


FIG. 12a

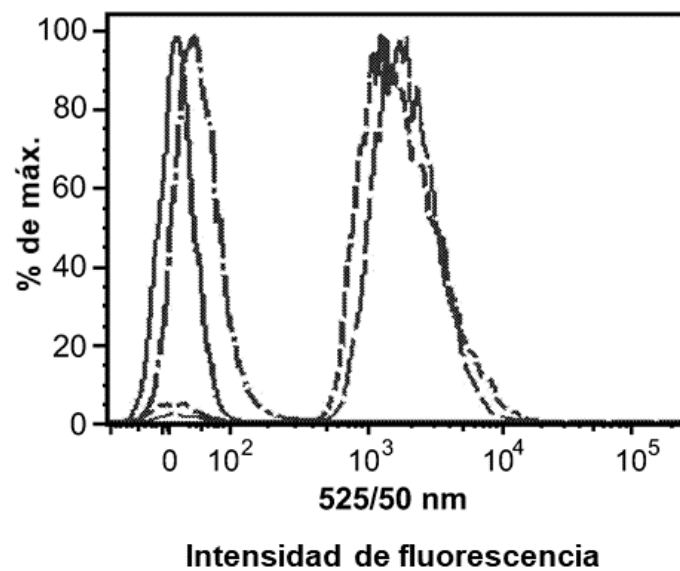


FIG. 12b

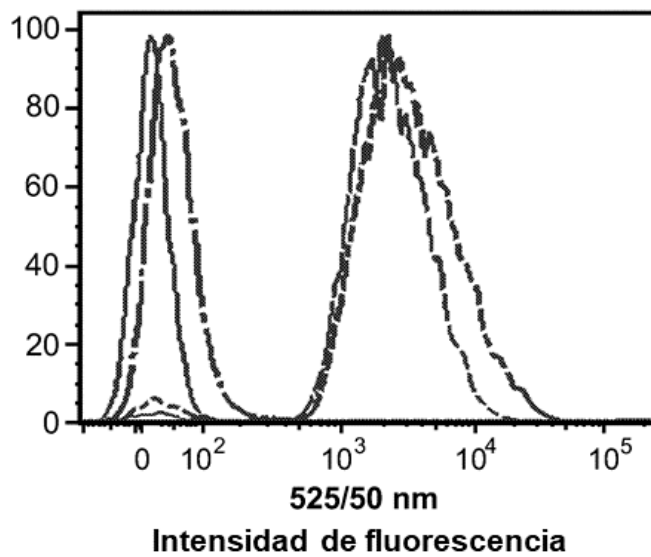


FIG. 12c

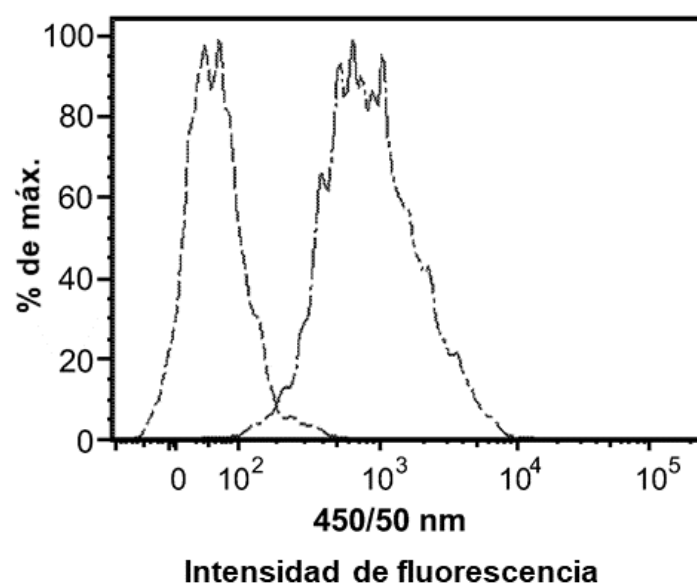


FIG. 13a

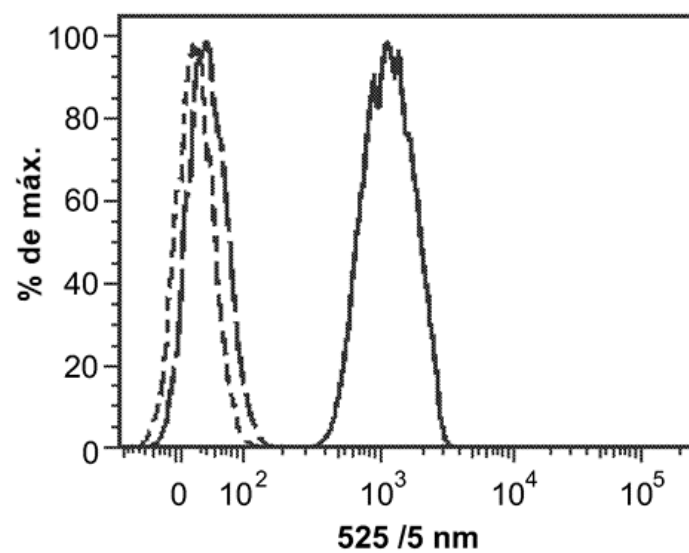


FIG. 13b

