

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 750 366**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

C12N 15/03 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.03.2013 PCT/EP2013/054670**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2013 WO13132040**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.03.2013 E 13710328 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 2823312**

54 Título: **Ensayo de potencia in vitro para vacunas meningocócicas basadas en proteína**

30 Prioridad:

08.03.2012 US 201261608293 P

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

25.03.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**GIULIANI, MARZIA y
MORI, ELENA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 750 366 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

Ensayo de potencia *in vitro* para vacunas meningocócicas basadas en proteína

Campo técnico

5 La presente invención pertenece al campo de los ensayos de unión para el análisis *in vitro* de vacunas que contienen proteínas para proteger contra *Neisseria meningitidis* (meningococo).

Técnica antecedente

10 A diferencia de las vacunas vivas que se cuantifican mediante titulación *in vitro*, la potencia de las vacunas inactivadas o de subunidades normalmente requiere una prueba *in vivo* para cada lote antes de su lanzamiento para el uso público [1], aunque existen varias excepciones, por ejemplo, la prueba de potencia IDRS (inmunodifusión radial simple) para la vacuna contra la influenza y el uso de ELISA para las vacunas contra la hepatitis B.

15 Las pruebas *in vivo* típicas implican una prueba de inmunización-desafío utilizando pequeños roedores (ratones o ratas) como modelo experimental. Dependiendo del tipo de vacuna, se utilizan diferentes puntos finales, como las tasas de muerte/supervivencia (pertussis de células enteras, toxoide diftérico y toxoide tetánico, vacuna antirrábica), signos clínicos (difteria, tétanos) o colonización (pertussis acelular y de células enteras). Al establecer una curva de dosis-respuesta en paralelo a una preparación estándar con potencia conocida, la potencia de la vacuna se puede expresar en relativo a esa preparación, por ejemplo, en unidades estándar

20 Un modelo de desafío no siempre está disponible. En esos casos, las pruebas de potencia generalmente se limitan a las respuestas serológicas, la de medición de las respuestas de anticuerpos se realiza después de la inmunización de los animales de prueba. Al menos parte de la funcionalidad de estos anticuerpos puede determinarse por su capacidad para neutralizar a el patógeno *in vitro* o por su capacidad para matar bacterias en presencia del complemento (como el ensayo de anticuerpos bactericidas en suero, o ABS, para meningococo).

El ensayo de ABS es útil pero engorroso e implica el sacrificio de muchos ratones. Como se explica en la referencia 1, es entonces deseable proporcionar alternativas *in vitro* para evaluar la potencia de la vacuna.

25 Un ensayo *in vitro* para analizar las vacunas MenB es la prueba ELISA "MATS" descrita en las referencias 2 y 3. Se demostró que la potencia relativa medida por MATS se correlaciona con la capacidad de matar cepas MenB en ABS.

La prueba MATS se utiliza para evaluar la cobertura de la cepa de una vacuna MenB, en lugar de analizar la inmunogenicidad de la vacuna. Sigue existiendo la necesidad de más y mejores ensayos *in vitro* para evaluar la inmunogenicidad de las vacunas contra el meningococo. Tales ensayos *in vitro* podrían utilizarse para confirmar que una vacuna particular tendrá la actividad *in vivo* esperada en receptores humanos.

30 Divulgación de la invención

35 La invención proporciona un ensayo de unión para el análisis *in vitro* de una muestra de vacuna que contiene proteína meningocócica de un lote de vacuna final en la forma en que se liberaría al público, que comprende los pasos de: (i) permitir a una proteína meningocócica inmunogénica dentro de la vacuna muestra para interactuar con un anticuerpo monoclonal que (a) es bactericida para el meningococo o (b) reconoce un epítipo conformacional en el inmunógeno meningocócico; luego (ii) medir la interacción entre el inmunógeno meningocócico y el anticuerpo del paso (i). La muestra se analiza en la forma en que se toma del lote, ya sea a plena potencia o después de la dilución. La vacuna incluye la proteína meningocócica pufH y el anticuerpo monoclonal utilizado en el paso (i) que reconoce a la proteína meningocócica pufH se selecciona de: 12C1/D7, cuya región V_L tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 21 y cuya región V_P tiene secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 22; 11F10/G6, cuya región V_L tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y cuya región V_P tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24; 30G11/H3, cuya región V_L tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 y cuya región V_P tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26; y 14B3/D4, cuya región V_L tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 y cuya región V_P tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28.

45 La invención también proporciona un procedimiento para el análisis *in vitro* de una muestra de prueba de una vacuna que contiene proteína meningocócica, que comprende los pasos de: (i) realizar el ensayo de unión anterior en la vacuna muestra de prueba y, opcionalmente, en al menos una dilución de la muestra de prueba; (ii) realizar el ensayo de unión anterior en una vacuna muestra estándar y, opcionalmente, en al menos una dilución de la vacuna muestra estándar; y (iii) comparar los resultados de los pasos (i) y (ii) para determinar la potencia de los inmunógenos en la vacuna de prueba en relación con la potencia de los inmunógenos en la vacuna estándar.

50 Ensayos de unión y formatos ELISA

La invención utiliza un ensayo de inmunosorbente ligado a una enzima (ELISA), que es bien conocido en la técnica. La invención puede utilizar cualquier formato de ELISA, incluidos los conocidos convencionalmente como ELISA directo, ELISA indirecto, ELISA sándwich y ELISA competitivo.

El paso (i) del ensayo ELISA de la invención implica permitir que un inmunógeno de proteína de unión al factor H (pufH) meningocócico dentro de la muestra interactúe con un anticuerpo monoclonal seleccionado de: 12C1/D7, cuya región V_L tiene secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 21 y cuya región V_P tiene secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 22; 11F10/G6, cuya región V_L tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y cuya región V_P tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24; 30G11/H3, cuya región V_L tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 y cuya región V_H tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26; y 14B3/D4, cuya región V_L tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 y cuya región V_H tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28. Las características de esta interacción (por ejemplo, homogénea o heterogénea) van a variar de acuerdo con el formato ELISA elegido. La interacción entre el anticuerpo monoclonal y el inmunógeno se detecta posteriormente en el paso (ii). Como es típico para ELISA, la interacción se puede medir cuantitativamente, de modo que el paso (ii) proporciona un resultado que indica la concentración del epítipo diana del anticuerpo monoclonal dentro de la vacuna muestra. Al utilizar un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo bactericida o conformacional, el resultado en el paso (ii) indica la concentración del epítipo funcional correspondiente en la vacuna muestra, y puede distinguir entre inmunógenos que retienen el epítipo relevante (y función) y aquellos que han perdido el epítipo (por ejemplo, debido a desnaturalización, agregación o descomposición durante el almacenamiento o por el mal manejo). En comparación con los valores obtenidos con una vacuna estándar de potencia conocida, los resultados del paso (ii) se pueden utilizar para calcular la potencia relativa (PR) de una vacuna de prueba.

El formato de ELISA preferido para utilizar con la invención es el ELISA competitivo (Figura 5). En este formato, la vacuna muestra se incuba con el anticuerpo monoclonal (anticuerpo primario) para que se puedan formar complejos entre el anticuerpo y los inmunógenos en la muestra. Estos complejos se agregan posteriormente a un contenedor en el que se inmovilizan los antígenos competidores. El anticuerpo que no está en complejo con los inmunógenos de la vacuna muestra es capaz de unirse a estos antígenos competidores inmovilizados; si la muestra contiene muchas dianas para el anticuerpo, entonces habrá menos anticuerpos que no formen parte del complejo para unirse a los antígenos competidores inmovilizados, mientras que habrá menos objetivos en la muestra (ya sea debido a menores cantidades de inmunógeno, por ejemplo, después de la dilución o debido a la pérdida de el epítipo del anticuerpo, por ejemplo, después de la desnaturalización de los inmunógenos) conduciendo a más anticuerpos que no forman parte del complejo. El anticuerpo que se une a los antígenos competidores inmovilizados (después de los pasos de lavado habituales, etcétera) se puede detectar agregando un anticuerpo secundario marcado que se une al anticuerpo monoclonal antivacuna (es decir, primario). La etiqueta se utiliza para cuantificar la cantidad de anticuerpo primario inmovilizado de las maneras normales. El uso de ELISA competitivo evita la necesidad de tener dos anticuerpos anti-inmunógenos diferentes que reconocen diferentes epítopes en el mismo inmunógeno, y también pueden dar mejores resultados en vacunas que incluyen múltiples componentes inmunogénicos diferentes. También permite que la vacuna de prueba se analice directamente, sin requerir ninguna manipulación antes de la prueba (aunque tales manipulaciones se pueden realizar si se desea).

Los antígenos competidores adecuados para la inmovilización incluyen a las proteínas meningocócicas que están presentes en la vacuna, o proteínas que comprenden a estas proteínas de la vacuna (por ejemplo, proteínas fusionadas), o proteínas que comprenden fragmentos de las proteínas de la vacuna (por ejemplo, formas truncadas). El antígeno competidor inmovilizado debe retener a el epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal relevante, de modo que pueda competir con los inmunógenos de la vacuna para unirse al anticuerpo. Típicamente, esto puede lograrse inmovilizando al antígeno de lotes frescos de la vacuna a granel o, preferiblemente, a partir de lotes frescos de inmunógeno purificado a granel antes de la preparación de la vacuna a granel.

El marcado de anticuerpos en un ELISA puede tomar varias formas. En el formato competitivo preferido, el anticuerpo secundario está marcado. En un ELISA, el anticuerpo se marca con una enzima, que posteriormente se utiliza para catalizar una reacción cuyo producto es fácilmente detectable. La enzima unida puede causar un cambio detectable en un sustrato enzimático que se agrega al anticuerpo marcado después de que este se inmoviliza, por ejemplo, para modificar un sustrato de una forma que cause un cambio en el color. Por ejemplo, la enzima puede ser una peroxidasa (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, PRP) o una fosfatasa (por ejemplo, fosfatasa alcalina, FA). También se pueden utilizar otras enzimas, por ejemplo, lacasa, β -galactosidasa, etcétera.

La elección del sustrato dependerá de la elección de la enzima unida. Por otra parte, los sustratos difieren en términos de costo, facilidad de uso, sensibilidad (es decir, límite inferior de detección) y compatibilidad con los equipos de imágenes disponibles. Estos parámetros son familiares para los expertos en ELISA. Los sustratos pueden sufrir un cambio colorimétrico, un cambio quimioluminiscente o un cambio quimi fluorescente cuando se ponen en contacto con la enzima unida. Los sustratos colorimétricos (y sus compañeros enzimáticos) incluyen, pero no se limitan a: FNFF o p-nitrofenil fosfato (FA); ABTS o 2,2'-Azinobis [3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico] (PRP); OFD o diclorhidrato de o-fenilendiamina (PRP); y TMB o 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (PRP). Los sustratos quimioluminiscentes incluyen luminol o 5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinediona (PRP), particularmente en presencia de fenoles modificados tales como p-yodofenol. Los sustratos quimi fluorescentes incluyen ácido p-hidroxi hidroxicinámico. También están disponibles varios sustratos patentados y se pueden utilizar con la invención si se desea, por ejemplo, QuantaBlu, QuantaRed, SuperSignal, Turbo TMB, etcétera.

Cuando un reactivo de ELISA se inmoviliza sobre una superficie sólida, esta superficie puede tomar diversas formas. Por lo general, el reactivo se inmoviliza sobre una superficie plástica, como una superficie hecha de poliestireno,

5 polipropileno, policarbonato o cicloolefina. El plástico generalmente será transparente e incoloro, particularmente cuando se utilizan sustratos enzimáticos cromogénicos. Se pueden utilizar plásticos blancos o negros cuando se utilizan sustratos luminiscentes o fluorescentes, como se conoce en la técnica. El plástico generalmente se utilizará en forma de una placa de micropocillos (placa de microtitulación) como se conoce en la técnica para ELISA (una placa plana que tiene múltiples pocillos individuales y de reacción). Dichas placas incluyen aquellas con 6, 24, 96 ó 384 pocillos de muestra, generalmente dispuestos en una matriz rectangular de 2:3. Las placas de micropocillos facilitan la preparación de series de dilución y también la transferencia de materiales de una placa a otra mientras mantienen relaciones espaciales, por ejemplo, en el paso de transferir una mezcla de anticuerpo y vacuna a una placa de micropocillos diferente para medir la interacción entre el anticuerpo y la vacuna.

10 Durante un ELISA puede ser deseable agregar un reactivo de bloqueo y/o un detergente, por ejemplo, para reducir las interacciones de unión no específicas que pueden distorsionar los resultados del ensayo. Los procedimientos de bloqueo son familiares para las personas que trabajan en el campo de ELISA.

15 Además de los formatos de ELISA discutidos anteriormente, el ensayo de unión de la invención puede utilizar cualquier variante de ELISA adecuada, como ELISA M&P o ELISA Reverso [4], el ELISA rápido de la referencia 5, etcétera, y también puede extenderse para utilizar alternativas al ELISA, como el análisis de inmunoafinidad de inyección de flujo (AIF), AlphaLISA o AlphaScreen [6], inmunoensayo fluorescente de lantánido mejorado por disociación (IFLMD), ELAST, el sistema de matriz de suspensión BIO-PLEX, MSD, etc. Cualquiera de estos ensayos de unión puede ser utilizado.

20 Como alternativa al uso de una enzima conjugada como etiqueta, es posible otro marcado. Por ejemplo, se pueden utilizar otros marcadores indirectos (es decir, alternativos a las enzimas), pero también es posible marcar el anticuerpo mediante conjugación a un marcador directo, como una partícula coloreada, un reactivo electroquímicamente activo, un reactivo redox, un isótopo radiactivo, una etiqueta fluorescente o una etiqueta luminiscente.

25 Como una alternativa adicional, el anticuerpo primario puede ser conjugado a una etiqueta de alta afinidad tal como biotina, avidina o estreptavidina. Una enzima conjugada con un ligando para la etiqueta, como avidina, estreptavidina o biotina, puede utilizarse para detectar anticuerpos primarios inmovilizados.

30 En algunos formatos de ELISA, en lugar de marcar a un anticuerpo secundario, se marcará el anticuerpo monoclonal antivacuna (ya sea un anticuerpo bactericida o uno que reconozca a un epítipo conformacional). Por lo tanto, el ensayo de la invención puede utilizar un anticuerpo monoclonal que se une inmuno específicamente a una proteína meningocócica (como pufH, etc., como se divulga en la presente memoria) y que se conjuga con una enzima (como FA o PRP). La unión inmuno específica puede contrastarse con la unión no específica y, por lo tanto, los anticuerpos de la invención tendrán una mayor afinidad (por ejemplo, una afinidad al menos 100 veces mayor) por la proteína diana meningocócica que, por una proteína de control irrelevante, como la albúmina de suero bovino.

La vacuna muestra

35 Los ensayos de la invención se utilizan para analizar vacunas. El ensayo se realiza en al menos una muestra de la vacuna, y este análisis revela información sobre la vacuna muestreada. El ensayo se realiza en una muestra de vacuna que contiene proteína meningocócica de un lote de vacuna final (formulada y empaquetada) en la forma en que se liberaría al público. Los resultados del ensayo se pueden utilizar para determinar el destino de ese lote, por ejemplo, si el lote es adecuado para su liberación para el uso por profesionales de la salud. Por lo general, se tomarán suficientes muestras de los lotes para garantizar el cumplimiento de las prácticas estadísticas que son normales para los ensayos de liberación de vacunas. La muestra de la vacuna se puede analizar con toda su potencia, es decir, en la forma en la que se toma del lote. En algunos casos, sin embargo, es útil analizar la vacuna en una fracción de potencia máxima, por ejemplo, después de la dilución. Los ensayos más útiles analizan una serie de resistencias, la más fuerte de las cuales puede ser una muestra de resistencia completa o puede tener una resistencia fraccional. Las diluciones se lograrán típicamente utilizando tampón en lugar de agua corriente. Tales tampones a veces pueden incluir tensioactivos tales como polisorbato 20 o polisorbato 80.

50 Es útil analizar una serie de diluciones de la vacuna. Por ejemplo, se pueden utilizar diluciones en serie 1:2, 1:5 ó 1:10 (por volumen). La serie de diluciones incluirá al menos a 2 miembros, pero generalmente incluirá más, por ejemplo, 5, 10 ó más miembros. Por ejemplo, 9 diluciones en serie a 1:2 dan 10 muestras a 1:2°, 1:2¹, 1:2², ..., 1:2⁹ y 1:2¹⁰ veces más que la muestra más fuerte. La serie de diluciones puede probarse utilizando los ensayos de la invención para proporcionar una serie de mediciones que pueden representarse (literal o nocionalmente) contra la dilución. Esta serie de mediciones se puede utilizar para evaluar la potencia relativa de la vacuna, como se describe a continuación. La vacuna incluye al menos un inmunógeno de proteína meningocócica, es decir, una proteína que, cuando se administra a seres humanos, provoca una respuesta inmune bactericida. En la técnica se conocen diversas proteínas de este tipo, incluidas, entre otras, AUHN, pufH y AdAN, como se encuentra en el producto BEXSERO™ [7,8]. Otros inmunógenos proteicos que pueden analizarse son HmbR, NspA, NhhA, App, Omp85, TbpA, TbpB y Cu, Zn-superóxido dismutasa. La vacuna incluye al menos el antígeno meningocócico pufH, y puede incluir uno o más de estos diversos antígenos, por ejemplo, puede incluir cada uno de AUHN, pufH y AdAN. También puede incluir formas variantes de un solo antígeno, por ejemplo, puede incluir más de una variante de pufH

meningocócica (es decir, dos proteínas pufH con diferentes secuencias [9]), utilizando diferentes anticuerpos monoclonales anti-pufH para reconocer a cada variante diferente por separado.

5 La vacuna puede incluir vesículas meningocócicas, es decir, cualquier vesícula proteoliposómica obtenida por ruptura o por una ampolla en la membrana externa meningocócica para formar vesículas a partir de la misma que
 10 tienen antígenos de la membrana externa. Por lo tanto, este término incluye, por ejemplo, VME (a veces denominadas "ampollas"), microvesículas (MVs) y "VME nativas" ("VMEN"). Se conocen diversas vesículas de este tipo en la técnica (por ejemplo, véase las referencias 10 a la 24) y cualquiera de estas puede incluirse dentro de una vacuna para ser analizada por la invención. En algunas realizaciones, sin embargo, la vacuna no tiene vesículas. Cuando una vacuna sí incluye vesículas, se prefiere utilizar un formato ELISA competitivo, ya que esto tiende a dar mejores resultados en muestras que contienen múltiples componentes.

15 Una vacuna analizada puede provocar preferiblemente una respuesta inmune en seres humanos que es protectora contra el meningococo del serogrupo B. Por ejemplo, la vacuna puede provocar una respuesta inmune que es protectora al menos contra una cepa prototipo de serogrupo B como MC58, que está ampliamente disponible (por ejemplo, ATCC BAA-335) y fue la cepa secuenciada en la referencia 25. Otras cepas también pueden ser probadas para la eficacia de la vacuna [2] pero una respuesta contra MC58 se prueba fácilmente.

Un ejemplo de una vacuna que puede analizarse según la invención es BEXSERO™ [7]. Esta vacuna incluye tres proteínas recombinantes diferentes, AUHN subvariante 1.2 (como una proteína fusionada AUHN-GNA1030), pufH sub-variante 1.1 (como una proteína fusionada GNA2091-pufH) y AdAN (subvariante 3.1). También contiene vesículas de membrana externa NZ98/254.

20 Además de los inmunógenos de proteínas meningocócicas, una vacuna puede incluir a otros inmunógenos. Estos pueden ser inmunógenos no proteicos del meningococo y/o inmunógenos de otras bacterias y/o inmunógenos de patógenos no bacterianos, como los virus. Así, por ejemplo, una vacuna analizada podría incluir: (a) uno o más
 25 sacáridos capsulares de meningococos, por ejemplo, de los serogrupos A, C, W135 y/o Y, como en los productos MENVEO, MENACTRA y NIMENRIX que incluyen sacáridos capsulares conjugados; (b) un antígeno de *Streptococcus pneumoniae*, tal como un sacárido (típicamente conjugado), como en los productos PREVNAR y SYNFLORIX; (c) un antígeno del virus de la hepatitis B, tal como el antígeno de superficie HBsAg; (d) un antígeno de *Bordetella pertussis*, como la holotoxina de pertussis (PT) y la hemaglutinina filamentosa (HAF) de *B. pertussis*, opcionalmente también en combinación con pertactina y/o aglutinógenos 2 y 3; (e) un antígeno de difteria, tal como un toxoide de difteria; (f) un antígeno tetánico, tal como un toxoide tetánico; (g) un antígeno sacárido de
 30 *Haemophilus influenzae* B (Hib), típicamente conjugado; y/o (h) antígenos de poliovirus inactivados.

La vacuna es una composición farmacéutica y, por lo tanto, además de sus inmunógenos, típicamente incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable, y una discusión exhaustiva de tales vehículos está disponible en la referencia 26.

35 El pH de una vacuna analizada está usualmente entre 6 y 8, y más preferiblemente entre 6.5 y 7.5 (por ejemplo, aproximadamente 7). El pH estable en una vacuna analizada puede mantenerse mediante el uso de un tampón, por ejemplo, un tampón de Tris, un tampón de citrato, un tampón de fosfato o un tampón de histidina. Por lo tanto, una vacuna analizada generalmente incluirá a un tampón.

Una vacuna analizada puede ser estéril y/o libre de pirógenos. Las composiciones pueden ser isotónicas con respecto a los humanos.

40 Una vacuna analizada comprende una cantidad inmunológicamente efectiva de antígeno(s), así como cualquier otro compuesto, según sea necesario. Por "cantidad inmunológicamente efectiva", se entiende que la administración de esa cantidad a un individuo, ya sea en una sola dosis o como parte de una serie, es efectiva para el tratamiento o para la prevención. Esta cantidad varía según la salud y la condición física del individuo a tratar, la edad, el grupo taxonómico de individuos a tratar (por ejemplo, primates no humanos, primates, etc.), la capacidad del sistema
 45 inmune del individuo para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, la evaluación del médico tratante sobre la situación médica y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad caiga en un intervalo relativamente amplio que puede determinarse a través de ensayos de rutina. El contenido de antígeno de las composiciones de la invención generalmente se expresará en términos de la masa de proteína por dosis. Puede ser útil una dosis de 10-500 µg (por ejemplo, 50 µg) por inmunógeno.

50 Las vacunas analizadas pueden incluir un adyuvante inmunológico. Así, por ejemplo, pueden incluir un adyuvante de sal de aluminio o una emulsión de aceite en agua (por ejemplo, una emulsión de escualeno en agua). Las sales de aluminio adecuadas incluyen hidróxidos (por ejemplo, oxihidróxidos), fosfatos (por ejemplo, hidroxifosfatos, ortofosfatos) (por ejemplo, véase los capítulos 8 y 9 de la referencia 27), o mezclas de los mismos. Las sales pueden tomar cualquier forma adecuada (por ejemplo, gel, cristalina, amorfa, etc.), prefiriéndose la adsorción de antígeno a
 55 la sal. La concentración de Al⁺⁺⁺ en una composición para administración a un paciente es preferiblemente inferior a 5 mg/ml, por ejemplo, ≤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. Los adyuvantes de hidróxido de aluminio son particularmente adecuados para el uso con vacunas contra el meningococo. Se ha demostrado que el ensayo de unión de la invención

proporciona resultados útiles a pesar de la adsorción de inmunógenos proteicos dentro de la vacuna, y el análisis es posible sin requerir una etapa de desorción (es decir, el análisis puede realizarse sin un pretratamiento de desorción de la vacuna). Cuando una vacuna incluye inmunógeno adsorbido, se prefiere utilizar un formato ELISA competitivo, ya que esto tiende a dar mejores resultados.

- 5 Las vacunas analizadas pueden incluir un antimicrobiano, particularmente cuando se empaquetan en un formato de dosis múltiple. Los antimicrobianos como el tiomersal y el 2-fenoxietanol se encuentran comúnmente en las vacunas, pero se prefiere utilizar un conservante sin mercurio o ningún conservante.

Las vacunas analizadas pueden comprender detergente, por ejemplo, un Tween (polisorbato), como Tween 80. Los detergentes generalmente están presentes en niveles bajos, por ejemplo, <0.01%. Las vacunas analizadas pueden incluir detergente residual (por ejemplo, desoxicolato) de la preparación de VME. La cantidad de detergente residual es preferiblemente inferior a 0.4 µg (más preferiblemente inferior a 0.2 µg) por cada µg de proteína MenB.

Si una vacuna analizada incluye LOS, la cantidad de LOS es preferiblemente menor que 0.12 µg (más preferiblemente menor que 0.05 µg) por cada µg de proteína.

15 Las vacunas analizadas pueden incluir sales de sodio (por ejemplo, cloruro de sodio) para dar tonicidad. Una concentración de 10±2 mg/ml de NaCl es típica, por ejemplo, de aproximadamente 9 mg/ml.

La vacuna estándar

El ensayo de la invención puede proporcionar información cuantitativa sobre las cantidades de epítopes funcionales en una vacuna. Si esta cantidad se compara con la cantidad en una vacuna de potencia conocida, entonces es posible calcular la potencia relativa de una vacuna de prueba. Por lo tanto, en algunos casos, la vacuna analizada es una vacuna estándar que tiene potencia conocida en un ensayo *in vivo*, por ejemplo, tiene una titulación conocida de ABS. En otros casos, la vacuna analizada es una vacuna de prueba que no tiene una potencia conocida en un ensayo *in vivo*. El ensayo se puede utilizar para analizar tanto una vacuna estándar como una vacuna de prueba, y los resultados del análisis de la vacuna de prueba se comparan con el análisis de la vacuna estándar, y esta comparación se utiliza para expresar la potencia de la vacuna de prueba en relación con la potencia conocida de la vacuna estándar.

Por ejemplo, después de la fabricación o el almacenamiento en lotes de una vacuna BEXSERO™, se puede analizar una muestra de prueba del lote utilizando el ensayo de la invención, y los resultados se pueden comparar con los obtenidos con BEXSERO™ con una potencia *in vivo* conocida. Esta comparación va a revelar si el lote nuevo/almacenado (la muestra de prueba) es tan potente como debería ser. Si es así, el lote se puede liberar para su uso posterior; si no lo es, puede ser investigado y/o descartado. Por ejemplo, el lote se puede liberar para distribución y uso público.

Para evaluar la potencia relativa, es útil analizar la vacuna de prueba y la vacuna estándar en una variedad de fortalezas. Como se discutió anteriormente, se puede analizar una serie de diluciones de las vacunas. La serie de diluciones se puede probar utilizando los ensayos divulgados en la presente memoria para proporcionar una curva (literal o nocional) de los resultados de los ensayos de unión contra la dilución. Esta curva se puede comparar con una curva estándar (es decir, la misma curva, pero obtenida con la vacuna estándar) para determinar la potencia relativa. Por ejemplo, al trazar el logaritmo de la titulación de unión contra el logaritmo de dilución para las vacunas de prueba y de referencia, la distancia horizontal entre las dos líneas de regresión paralelas indica una potencia relativa (no hay separación horizontal que indique una potencia relativa del 100% o 1.0).

40 Para simplificar las comparaciones, las diluciones utilizadas para la vacuna de prueba deben ser las mismas que las utilizadas para la vacuna de referencia (por ejemplo, una serie de diluciones 1:2, 1:5 o 1:10 para ambas vacunas).

Se puede realizar una prueba de potencia relativa varias veces para poder determinar la variación del ensayo, por ejemplo, varias veces (duplicado, triplicado, etc.) en una sola muestra, y/o realizado en múltiples muestras del mismo granel/lote. Esto puede implicar determinar la variación en tales ensayos múltiples (por ejemplo, el coeficiente de variación) como un parámetro útil, y en algunos casos los resultados del ensayo pueden ser considerados útiles solo cuando la variación cae dentro de límites aceptables, por ejemplo <15%.

A veces se permite una variación más amplia, por ejemplo, <20%, dependiendo de si las pruebas se realizan dentro de (sesiones intra-ensayo) o en diferentes sesiones experimentales (inter-ensayos).

50 Cuando una vacuna incluye múltiples inmunógenos diferentes, la potencia de cada uno de estos se prueba, idealmente, por separado. Estos resultados se pueden combinar para un análisis de la vacuna muestra como un todo, pero es útil para identificar la causa específica de cualquier pérdida de potencia general.

El anticuerpo

Los ensayos de la invención utilizan anticuerpos monoclonales que reconocen inmunógenos proteicos que están presentes dentro de las vacunas analizadas. La invención utiliza anticuerpos que son bactericidas para el

meningococo o que reconocen epítopes conformacionales en los inmunógenos meningocócicos. En ambos casos, los anticuerpos pueden distinguir entre inmunógeno funcional e inmunógeno desnaturalizado o no funcional. Se prefiere el uso de anticuerpos bactericidas.

5 La determinación de si un anticuerpo es bactericida contra el meningococo es una rutina en la técnica y puede ser evaluado mediante ABS [28-31]. La referencia 32 reporta una buena reproducibilidad entre laboratorios de este ensayo cuando se utilizan procedimientos armonizados. ABS se puede ejecutar contra la cepa H44/76 (cepa de referencia 237 de la base de datos PubMLST; designación de cepa B: P1.7,16: F3-3: ST-32 (cc32); también conocida como 44/76-3 o Z3842). Para los propósitos actuales, sin embargo, un anticuerpo puede considerarse bactericida si mata a la cepa MC58 utilizando complemento humano.

10 Determinar si un anticuerpo reconoce a un epítipo conformacional también es sencillo. Por ejemplo, el anticuerpo se puede probar contra un panel de fragmentos de péptidos lineales del antígeno diana (por ejemplo, utilizando la técnica de Pepsican) y la unión se puede comparar con la unión del anticuerpo contra el antígeno completo. Como alternativa, la unión se puede comparar antes y después de la desnaturalización del antígeno diana.

15 Los ensayos de la invención utilizan un anticuerpo monoclonal que reconoce a la proteína pufH meningocócica se selecciona de: 12C1/D7, cuya región V_L tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 21 y cuya región V_P tiene secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 22; 11F10/G6, cuya región V_L tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y cuya región V_P tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24; 30G11/H3, cuya región V_L tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 y cuya región V_P tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26; y 14B3/D4, cuya región V_L tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 y cuya región V_P tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28. Los ensayos de la invención pueden utilizar una mezcla de anticuerpos monoclonales. Típicamente, una vacuna incluirá múltiples inmunógenos diferentes y cada uno de estos requerirá un anticuerpo monoclonal diferente para su análisis. Por lo tanto, un ensayo puede utilizar: un anticuerpo monoclonal sencillo (seleccionado de 12C1/D7, 11F10/G6, 30G11/H3 ó 14B3/D4), que reconoce a un solo inmunógeno meningocócico pufH; una pluralidad de diferentes anticuerpos monoclonales que reconocen a un solo inmunógeno de pufH meningocócico (típicamente epítopes diferentes en el inmunógeno); una pluralidad de anticuerpos monoclonales diferentes que reconocen a una pluralidad de inmunógenos diferentes, en los que hay uno o más anticuerpo/anticuerpos por inmunógeno (típicamente reconocen diferentes epítopes si se dirigen al mismo inmunógeno). Sin embargo, para evitar dudas, el ensayo de la invención utiliza al menos a un anticuerpo monoclonal seleccionado de 12C1/D7, 11F10/G6, 30G11/H3 ó 14B3/D4, que reconoce a el antígeno meningocócico pufH.

25 Se puede analizar un anticuerpo para asegurarse de que no reacciona de forma cruzada con otros antígenos que podrían estar presentes en una vacuna. Esta prueba es sencilla, y dichos anticuerpos de reacción cruzada pueden utilizarse con precaución y con los controles adecuados, o se pueden rechazar a favor de los anticuerpos que no tienen la actividad de reacción cruzada.

30 Para facilitar la determinación de la potencia relativa, el anticuerpo monoclonal debería mostrar una respuesta de unión lineal cuando un antígeno diana diluido, es decir, la dilución del antígeno diana debería producir una reducción correspondiente en la unión por el anticuerpo. La linealidad se puede evaluar mediante regresión lineal, por ejemplo, tener $R^2 \geq 0.95$.

Los anticuerpos monoclonales utilizados en el ensayo de la invención son anticuerpos monoclonales murinos.

40 Los anticuerpos monoclonales utilizados en el ensayo de la invención que reconocen a el antígeno meningocócico pufH tienen una cadena pesada tipo γ , dando lugar a anticuerpos de clase IgG, más específicamente, IgG2b. Un anticuerpo IgG nativo tiene dos cadenas ligeras idénticas (un dominio constante C_L y un dominio variable V_L) y dos cadenas pesadas idénticas (tres dominios constantes C_{H1} C_{H2} y C_{H3} y un dominio variable V_H), unidas por puentes disulfuro.

45 El término "anticuerpo" no se limita a los anticuerpos nativos, como se encuentran naturalmente en mamíferos. El término abarca a cualquier molécula similar que pueda desempeñar el mismo papel en un inmunoensayo como ELISA. Así, el anticuerpo puede ser, por ejemplo, un fragmento de un anticuerpo nativo que retiene la actividad de unión al antígeno (por ejemplo, un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento Fv), una cadena sencilla Fv" que comprende un dominio VP y VL como una cadena polipeptídica sencilla, un "diacuerpo", un "triacuerpo", un dominio variable único o anticuerpo VHH, un "dominio de anticuerpo"(dAc), un anticuerpo quimérico que tiene dominios constantes de un organismo pero dominios variables de un organismo diferente, un anticuerpo injertado con RDC, etc. El anticuerpo puede incluir un único sitio de unión al antígeno (por ejemplo, como en un fragmento Fab o un Fvcs) o múltiples sitios de unión al antígeno (por ejemplo, como en un $F(ab')_2$ fragmentos o un diacuerpo o un anticuerpo nativo). Sin embargo, cuando un anticuerpo tiene más de un sitio de unión al antígeno, es preferible un anticuerpo monoespecífico, es decir, todos los sitios de unión al antígeno reconocen a el mismo antígeno. El anticuerpo puede tener un dominio constante (por ejemplo, que incluye dominios C_H o C_L), pero esto no siempre es necesario. Por lo tanto, el término "anticuerpo" abarca un intervalo de proteínas que tienen diversas características estructurales (que generalmente incluyen al menos un dominio de inmunoglobulina que tiene un pliegue de proteína todo- β con un sándwich de 2 capas de cadenas β antiparalelas dispuestas en dos láminas β), pero todas las proteínas poseen la capacidad de unirse a los inmunógenos proteicos diana.

El término "monoclonal" como se utilizaba originalmente en relación con los anticuerpos se refería a anticuerpos producidos por una sola línea clonal de células inmunes, en oposición a los anticuerpos "policlonales" que, aunque todos reconocen a la misma proteína diana, fueron producidos por diferentes células B y se dirigirían a diferentes epítopes en esa proteína. Como se utiliza en la presente memoria, la palabra "monoclonal" no implica ningún origen celular en particular, sino que se refiere a cualquier población de anticuerpos que tengan la misma secuencia de aminoácidos y reconozcan a el mismo epítipo o epítopes en la misma proteína o proteínas diana. Por lo tanto, se puede producir un anticuerpo monoclonal utilizando cualquier sistema de síntesis de proteínas adecuado, incluyendo células inmunes, células no inmunes, sistemas acelulares, etc. Este uso es habitual en el campo, por ejemplo, las hojas de datos del producto para el anticuerpo humanizado injertado con RDC Synagis™ expresado en una línea celular de mieloma murino NS0, el anticuerpo humanizado Herceptin™ expresado en una línea celular CHO y el anticuerpo exhibido en fagos Humira™ expresado en una línea celular CHO se refieren a los productos como anticuerpos monoclonales. El término "anticuerpo monoclonal", por lo tanto, no está limitado con respecto a la especie o fuente del anticuerpo, ni por la forma en la que se fabrica.

El ensayo de la invención requiere el uso de un anticuerpo monoclonal seleccionado de: 12C1/D7; 11F10/G6; 30G11/H3; y 14B3/D4, cada uno de los cuales reconoce a el antígeno pufH meningocócico. Además, a continuación se describen otros anticuerpos útiles para el análisis de los inmunógenos en BEXSERO™:

- Un anticuerpo monoclonal adecuado para analizar AUHN como se encuentra en el producto BEXSERO™ es el anticuerpo 42A4A2 (IgG1 murino) que probablemente reconoce a un epítipo conformacional.

- Además de los anticuerpos 12C1/D7, 11F10/G6, 30G11/H3 y 14B3/D4, otros anticuerpos monoclonales para analizar pufH como se encuentran en el producto BEXSERO™ incluyen, pero no se limitan a, el anticuerpo MAb502 [33,34]. Al igual que 12C1/D7 y 11F10/G6, este anticuerpo es bactericida. Sin embargo, MAb502 (IgG2a murino) no proporciona una buena linealidad cuando se diluye, por lo que son preferibles 12C1/D7 y 11F10/G6 (ambos IgG2b murinos). Los anticuerpos JAR3 y JAR5 (referencia 35; los genes en GenBank de V_L y V_P son JF715927, F715926, JF715929 y JF715928) también pueden utilizarse, al igual que otros anticuerpos JAR de la técnica anterior, por ejemplo, hasta JAR35 [36]. El anticuerpo monoclonal anti-pufH puede unirse a una única variante de pufH, o puede unirse a más de una variante (como los anticuerpos JAR3 y JAR5, como se reporta en la referencia 37).

- Un anticuerpo monoclonal adecuado para analizar AdAN como se encuentra en el producto BEXSERO™ es el anticuerpo bactericida 9F11/19 (IgG2b murino).

El ensayo de un componente de vesícula en una vacuna puede utilizar cualquier antígeno en la vesícula, pero es conveniente utilizar anticuerpos anti-PorA ya que estos están fácilmente disponibles para el análisis de sero subtipo (por ejemplo, de NIBSC). Por lo tanto, para analizar el componente de VME como se encuentra en el producto BEXSERO™, un anticuerpo monoclonal adecuado reconoce al serosubtipo P1.4.

Un anticuerpo secundario utilizado con el ensayo divulgado (por ejemplo, en el formato competitivo del ensayo) puede reconocer a el anticuerpo primario cuando el anticuerpo primario se ha inmovilizado. El anticuerpo secundario es típicamente policlonal. Por ejemplo, si el anticuerpo primario es murino, entonces el anticuerpo secundario puede ser un anticuerpo anti-murino, por ejemplo, IgG anti-ratón de cabra. Los criterios adecuados para elegir anticuerpos secundarios son bien conocidos en el campo de ELISA.

General

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, procedimientos convencionales de química, bioquímica, biología molecular, inmunología y farmacología, dentro de la habilidad de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la literatura. Véase, por ejemplo, las referencias 38-44.

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

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

Cuando la divulgación se refiere a un "epítipo", este epítipo puede ser un epítipo de células B y/o un epítipo de células T, pero generalmente va a ser un epítipo de células B. Dichos epítopes pueden identificarse de forma empírica (por ejemplo, utilizando PEPSCAN [45,46] o procedimientos similares), o pueden predecirse (por ejemplo, utilizando el índice antigénico de Jameson-Wolf [47], enfoques basados en matriz [48], MAPITOPE [49], TEPITOPE [50,51], redes neuronales [52], OptiMer & EpiMer [53, 54], ADEPT [55], Tsites [56], hidrofiliidad [57], índice antigénico [58] o los procedimientos descritos en las referencias 59-63, etc.). Los epítopes son las partes de un antígeno que se reconocen y se unen a los sitios de unión al antígeno de los anticuerpos o los receptores de células T, y también pueden denominarse "determinantes antigénicos".

Las referencias a un porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos significa que, cuando se alinean, ese porcentaje de aminoácidos es el mismo al comparar a las dos secuencias. Este alineamiento y % de homología o identidad de secuencia se puede determinar utilizando programas de software conocidos en la técnica, por ejemplo, los descritos en la sección 7.7.18 de la referencia 64. El algoritmo de búsqueda de homología

Smith-Waterman determina un alineamiento preferido utilizando una búsqueda de espacio afín con una penalización de espacio abierto de 12 y una penalización de extensión de espacio de 2, la matriz BLOSUM de 62. El algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman se describe en la referencia 65.

5 La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente" por ejemplo, una composición que está "sustancialmente libre" de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando sea necesario, la palabra "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la divulgación.

Inmunógenos proteicos meningocócicos

AUHN (Antígeno de Unión a Heparina Neisserial)

10 Se incluyó al AUHN [68] en la secuencia del genoma publicada para la cepa del serogrupo B meningocócica MC58 [25] como el gen NMB2132 (número de acceso de GenBank GI: 7227388). Desde entonces se han publicado secuencias de AUHN de muchas cepas. Por ejemplo, las formas alélicas de AUHN (denominadas proteínas '287') se pueden ver en las Figuras 5 y 15 de la referencia 66, y en el ejemplo 13 y la figura 21 de la referencia 67 (SEQ IDs de 3179 a 3184). También se han reportado varios fragmentos inmunogénicos del AUHN.

15 Los antígenos AUHN ventajosos para utilizar con esta divulgación pueden provocar anticuerpos antimeningocócicos bactericidas después de la administración a un sujeto.

La sobreexpresión de AUHN se ha logrado previamente de varias maneras, por ejemplo, introducción de un gen AUHN bajo el control de un promotor inducible por IPTG [68].

adAN (adhesina A Neisserial)

20 El antígeno AdAN se incluyó en la secuencia del genoma publicada para la cepa de serogrupo B meningocócica MC58 [25] como el gen NMB1994 (número de acceso de GenBank GI: 7227256). Las secuencias del antígeno AdAN de muchas cepas se han publicado desde entonces, y la actividad de la proteína como una adhesina Neisserial ha sido bien documentada. También se han reportado varios fragmentos inmunogénicos de AdAN.

Los antígenos ventajosos de AdAN para utilizar con esta divulgación pueden provocar anticuerpos antimeningocócicos bactericidas después de la administración a un sujeto.

25 *pufH (proteína de unión al factor H)*

30 El antígeno pufH se ha caracterizado en detalle. También se le conoce como proteína '741' [SEQ IDs 2535 y 2536 en la referencia 67], 'NMB1870', 'GNA1870' [69-71], 'P2086', 'LP2086' u 'ORF2086' [72-74]. Es naturalmente una lipoproteína y se expresa en todos los serogrupos meningocócicos. La RMN [75] ha determinado la estructura del dominio inmunodominante C-terminal de pufH ('pufHC'). Esta parte de la proteína forma un barril β de ocho cadenas, cuyas cadenas están conectadas por bucles de longitudes variables. El barril está precedido por una hélice α corta y una cola N-terminal flexible.

35 El antígeno pufH se divide en tres variantes distintas [76] y se ha encontrado que el suero producido contra una familia dada es bactericida dentro de la misma familia, pero no es activo contra cepas que expresan a una de las otras dos familias, es decir, hay protección cruzada intrafamiliar, pero no protección cruzada interfamiliar. La invención puede utilizar una única variante de pufH, pero una vacuna incluirá útilmente a una pufH de dos o tres de las variantes.

40 Una pufH útil que puede utilizarse de acuerdo con esta divulgación es una de las formas modificadas divulgadas, por ejemplo, en la referencia 77, por ejemplo, que comprende SEQ ID NO: 20 o 23 de la misma. Estas formas modificadas pueden provocar respuestas de anticuerpos que son ampliamente bactericidas contra los meningococos. SEQ ID NO: 77 en la referencia 77 es otra secuencia útil de pufH que se puede utilizar.

Las proteínas de pufH en una VME generalmente se van a lipidar, por ejemplo, en una cisteína en el N-terminal. Alternativamente, pueden no estar lipidados.

45 Una vacuna que puede analizarse mediante los procedimientos de esta divulgación incluye dos variantes diferentes de pufH. Estos están idealmente lipidados en sus cisteínas N-terminales. Esta vacuna puede incluir un adyuvante de fosfato de aluminio, y también puede incluir un tampón de histidina y polisorbato 80. Idealmente, incluye masas iguales de los dos polipéptidos pufH diferentes.

Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales, que reconocen a los antígenos de pufH meningocócicos y pueden utilizarse con los ensayos de la invención, son:

50 "12C1/D7" - Su región V_L tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y su región V_P tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22;

"11F10/G6" - Su región VL tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y su región V_P tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24;

"30G11/H3" - Su región VL tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 y su región V_P tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26; y

5 "14B3/D4" - Su región VL tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 y su región V_P tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28.

Descripción breve de las figuras

10 La Figura 1 muestra gráficas de potencia relativa para inmunógenos AUHN, pufH, AdAN y VME en BEXSERO™ utilizando anticuerpos monoclonales (A) 42A4A2 (B) MAb502 (C) 12C1/D7 (D) 11F10/G6 (E) 9F11/19 (F) Anti-PorA. Cada gráfica muestra el registro (DO_{405-620nm}) contra el registro (dilución). Los círculos muestran datos para la vacuna estándar; los triángulos para la vacuna de prueba.

La Figura 2 muestra gráficas de potencia relativa para otros dos lotes de VME en BEXSERO™.

15 La Figura 3 muestra los valores de PR para las vacunas calentadas durante la noche. Los cuatro grupos de las cuatro barras son, de izquierda a derecha: pufH; AUHN; AdAN; y VMEs. Dentro de cada grupo, las cuatro barras son: 37°C; 50°C; 60°C; y 80°C.

La Figura 4 muestra gráficas de PR para la vacuna estándar (círculos) y para el adyuvante (triángulos) utilizando anticuerpos monoclonales (A) MAb502 (B) 42A4A2 (C) 9F11/19 y (D) Anti-PorA.

20 La figura 5 ilustra un ELISA de la invención en formato competitivo. En la parte superior, el anticuerpo monoclonal (A) para uno de los inmunógenos de la vacuna se mezcla con la vacuna muestra (B) en diez pocillos que tienen una vacuna cada vez más diluida en cada pocillo. En (C) esta mezcla se transfiere a los pocillos de una segunda placa, cuyos pocillos están recubiertos con inmunógeno de vacuna inmovilizada. Después de la incubación, las placas se lavan (D), luego se agrega suero anti-mAb conjugado con enzima en el paso (E), después de lo cual la enzima se utiliza para catalizar una reacción detectable para la producción de ELISA.

Modos para llevar a cabo la invención

25 El producto BEXSERO™ se describe en la referencia 7 e incluye 50 µg de cada uno de AdAN (subvariante 3.1), subvariante pufH 1.1 (como proteína fusionada GNA2091-pufH) y subvariante AUHN 1.2 (como proteína fusionada AUHN-GNA1030), adsorbido en 1.5 mg de hidróxido de aluminio, y con 25 µg de VME de la cepa NZ98/254 de *N. meningitidis*.

Los siguientes anticuerpos monoclonales están disponibles:

- 30 (A) 42A4A2 (IgG1 murino contra AUHN)
 (B) MAb502 (IgG2a murino contra pufH)
 (C) 12C1/D7 (IgG2b murino contra pufH)
 (D) 11F10/G6 (IgG2b murino contra pufH)
 (E) anticuerpo 9F11/19 (IgG2b murino contra AdAN)
 35 (F) Anti-PorA (P1.4), disponible de NIBSC.

Estos anticuerpos son bactericidas, excepto por 42A4A2 (que no es bactericida, pero parece reconocer a un epítipo conformacional).

40 El producto BEXSERO™ se diluye en serie 9 veces, ya sea 1:2 o 1:5 cada vez. Seis de estas series de dilución están presentes en las filas (A) a (F) de una primera placa de microtitulación (placa 1), desde las columnas 1 (más fuertes) a 10 (más diluidas). Cada fila recibe uno de los seis anticuerpos monoclonales (A) a (F) descritos anteriormente, cada uno utilizado con la misma intensidad en cada columna. Después de la incubación, el contenido de estos 60 pocillos se transfiere a 60 pocillos en una segunda placa (placa 2). Los pocillos en las filas (A) a (F) en la placa 2 están recubiertos con las proteínas recombinantes individuales (A) AUHN (B-D) pufH (E) AdAN y (F) PorA. En otras realizaciones, todos los pocillos en una única placa ELISA se recubren utilizando el mismo antígeno, y cada antígeno se prueba por separado utilizando una placa de microtitulación ELISA diferente.

45 La mezcla se incuba durante 2 horas a 37°C (para pufH) o a temperatura ambiente (para AUHN, AdAN y PorA), y posteriormente se lava. Los anticuerpos monoclonales que no estaban unidos a los antígenos de la vacuna se retienen en las placas. El IgG anti-ratón, conjugado con fosfatasa alcalina, es luego agregado a los 60 pocillos con pNPP y la cantidad de anticuerpo monoclonal retenido se evalúa por DO_{405-620nm}. Por lo tanto, el inmunógeno de la vacuna (diluido en serie) inhibe la unión de los anticuerpos monoclonales a los antígenos inmovilizados en la placa

2. Los niveles más altos del epítipo en la vacuna muestra conducirán a una mayor inhibición de esta unión y, por lo tanto, a una señal menos detectable después de agregar pNPP.

Las Figuras 1A a 1F muestran los resultados de las seis filas. Las gráficas también incluyen datos medidos con una vacuna de referencia, y la comparación de las dos líneas paralelas revela las siguientes potencias relativas:

5

	A	B	C	D	E	F
P.R.	0.915	2.344	0.859	0.895	1.037	1.033

El valor aberrante en la Figura 1B (es decir, utilizando MAb502) surgió porque las curvas no eran lineales y no eran paralelas entre sí. En todos los demás casos, las curvas fueron lineales con buenos valores de R². Por lo tanto, el ensayo es adecuado para evaluar la potencia relativa.

10 Para verificar la consistencia entre ensayos, se realizó la medición anti-PorA para otros dos lotes de BEXSERO™ (Figuras 2A y 2B). Los resultados en las Figuras 1F, 2A y 2B no muestran grandes diferencias, y la PR fue 1.033, 0.917 y 0.893 en los tres lotes de vacunas diferentes.

La capacidad de este ensayo para identificar vacunas dañadas se probó exponiendo artificialmente un producto BEXSERO™ al estrés térmico. Los valores de potencia relativa para cada uno de los cuatro componentes inmunogénicos después de 2 horas a 80°C fueron los siguientes:

15

	AUHN	pufH	adAN	VME
P.R.	0.25	0.08	0.01	0.55

La Figura 3 muestra los valores de potencia relativa para cada uno de los cuatro componentes inmunogénicos después de la incubación durante la noche a 37°C, 50°C, 60°C y 80°C. Por lo tanto, el ensayo puede detectar pérdidas en la potencia causadas por el maltrato térmico.

20

Para confirmar que el adyuvante de hidróxido de aluminio no interfirió con el ensayo, se analizaron los anticuerpos (A), (B), (E) y (F) con la vacuna estándar o con el adyuvante. Como se muestra en la Figura 4, el adyuvante siempre mostró su incapacidad para competir y/o interferir con la unión de cada anticuerpo monoclonal al inmunógeno respectivo.

25 Anticuerpos monoclonales anti-pufH

Se obtuvieron cuatro anticuerpos monoclonales bactericidas murinos anti-pufH IgG2b subclase: 12C1/D7; 11F10/G6; 30G11/H3; y 14B3/D4. El ARN se aisló de las células de hibridoma murino utilizando el mini kit Oligotex Direct mRNA de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADNc se produjo mediante transcripción reversa utilizando ~200 ng de la plantilla de poli(A) + templado de ARN, un cebador oligo-(dT) y SuperScript II RT. El ADNc se amplificó por PCR utilizando cebadores degenerados de la cadena pesada (P) y de la ligera (L) de la inmunoglobulina como se describe en la referencia 78. Los productos purificados se insertaron en el vector pSTBlue-1 Perfectly Blunt para la secuenciación.

30

La región V_L de 12C1/D7 tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21:

DIVLTQSPSSIYASLGERVTLTCKASQDIHNYLNWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVP SRFSGGGSGQDY
SLTISSLEFEDIGIYYCLQYDEFPPTFGGGTRLEIKRADAAPTVS

35 y su región V_H tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22:

QVQLQESGPPELVKPGASVKISCKASGYSFSDYNMSWVKQSNKGSLEWIGIIDPKYGTINYNQKFKGKATLT
VDQASSTAYMQLNLSLTSEDSAVYYCVRDYYGSSYFDYWGQGTLLTVS

La región V_L de 11F10/G6 tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23:

ES 2 750 366 T3

DIVLTQTPSSIIYASLGERVTLTCKASQDIHNYLNWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVP SRFSGGGSGQDY
SLTISSLEFEDIGIYYCLQYDEFPPTFGGGTRLEIKRADAAPT VS

y su región V_P tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24:

EFQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFSDYNMSWVKQSNNGKSLEWIGIIDPKYGTINYNQKFKGKATLT
VDQASSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCVRDYYGSSYFDYWGQGTTLTVS

La región V_L de 30G11/H3 tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25:

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSIITCKASQHVRTAVAWYQQKPGQSPKGLIYLASNRRTGVPDRFTASGSGTDF
TLTITNVQSEDLADYFCLQHWNYPFYFGSGTKLEIKRADAAPT VS

5

y su región V_P tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26:

EVQLEESGPELVKPGASVKISCKASGYSFSDYNMSWVKQSNNGKSLEWIGIIDPKYGTINYNQKFKGKATLT
VDQASSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCVRDYYGSSYFDYWGQGTTLTVS

La región V_L de 14B3/D4 tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27:

DIVLTQSPSSSLTVTAGEKVTMSCRSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGS
GSGTDFTLTISSVQAEDLAIYYCQNDYNYPLTFGAGTKLELKR

10 y su región V_P tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28:

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYSFYTYWVNWVKQRPGQGLEWIGMIHPNSGSTNYNEKFKNKATL
TVDKSSSTAYIQLSSLTSEDSAVFYCAAHYNYKYEYFYAMDYWGQGTSTVTVSS

15 En un ensayo de FACS, 1F10/G6 y 30G11/H3 fueron capaces de unirse a cepas meningocócicas que tenían cada una de las tres variantes diferentes de pufH: MC58 (variante 1); 961-5945 (variante 2); y M1239 (variante 3). Además, estos dos anticuerpos positivos para FACS también mostraron actividad bactericida contra cepas que tienen cada una de las tres variantes.

14B3/D4 fue FACS positivo y bactericida contra MC58 y 961-5945, pero no contra M1239. 12C1/D7 fue FACS positivo y bactericida contra MC58, pero no contra 961-5945 ó M1239.

12C1/D7 y 11F10/G6 compitieron con el fH por unirse a pufH; los otros dos anticuerpos no lo hicieron.

El epítipo para 11F10/G6 parece incluir a el residuo Lis-268 en pufH (var 1.1).

20 El epítipo para 12C1/D7 parece incluir a el residuo Val-270 en pufH (var 1.1).

El epítipo para 14B3/D4 parece incluir a los residuos 60-90 en pufH.

El epítipo para 30H11/H3 parece incluir a el residuo Lis-257 en pufH (var 1.1).

Referencias

- 25 [1] Metz et al. (2002) Vaccine 20:2411-30.
[2] Donnelly et al. (2010) PNAS USA 107:19490-5.
[3] US-2010/0035234.
[4] US-7510687.
[5] WO2007/066231.
[6] Poulsen & Jensen (2007) J Biomol Screen 12:240-7.

- [7] Bai et al. (2011) *Expert Opin Biol Ther.* 11:969-85.
- [8] Giuliani et al. (2006) *PNAS USA* 103:10834-9.
- [9] Marsh et al. (2011) *Vaccine* 29:6049-58.
- [10] WO02/09643.
- 5 [11] Katial et al. (2002) *Infect. Immun.* 70:702-707.
- [12] US patent 6,180,111.
- [13] WO01/34642.
- [14] WO2006/046143.
- [15] WO2004/019977.
- 10 [16] European patent 0011243.
- [17] Fredriksen et al. (1991) *NIPH Ann.* 14(2):67-80.
- [18] WO01/91788.
- [19] WO2005/004908.
- [20] WO2011/036562.
- 15 [21] Claassen et al. (1996) *Vaccine* 14:1001-8.
- [22] de Kleijn et al. (2000) *Vaccine* 18:1456-66.
- [23] WO03/105890.
- [24] WO2006/024946
- [25] Tettelin et al. (2000) *Science* 287:1809-1815.
- 20 [26] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20th edition, ISBN: 0683306472.
- [27] *Vaccine Design...* (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.
- [28] Borrow et al. (2006) *Vaccine*. 24:5093-107.
- [29] Rodriguez et al. (2002) *Clin Vaccine Immunol* 9:109-14.
- [30] Borrow & Carlone (2001) *Methods in Molecular Medicine* 66:289-304.
- 25 [31] Martin et al. (2005) *Vaccine* 23:2218-21.
- [32] Borrow et al. (2005) *Clin Diag Lab Immunol* 12:970-6.
- [33] WO2009/150531.
- [34] Scarselli et al. (2009) *J Mol Biol* 386:97-108.
- [35] Welsch et al. (2004) *J Immunol* 172:5606-15.
- 30 [36] Beernink et al. (2009) *Molecular Immunology* 46:1647-53.
- [37] Giuntini et al. (2011) *Infect. Immun.* 79:3751-9.
- [38] *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.)
- [39] *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds, 1986, Blackwell Scientific Publications)
- 35 [40] Sambrook et al. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- [41] *Handbook of Surface and Colloidal Chemistry* (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997)

- [42] Ausubel et al. (eds) (2002) Short protocols in molecular biology, 5th edition (Current Protocols).
- [43] Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, (Ream et al., eds., 1998, Academic Press)
- [44] PCR (Introduction to Biotechniques Series), 2nd ed. (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag)
- [45] Geysen et al. (1984) PNAS USA 81:3998-4002.
- 5 [46] Carter (1994) Methods Mol Biol 36:207-23.
- [47] Jameson, BA et al. 1988, CABIOS 4(1):181-186.
- [48] Raddrizzani & Hammer (2000) Brief Bioinform 1(2): 179-89.
- [49] Bublil et al. (2007) Proteins 68(1):294-304.
- [50] De Lalla et al. (1999) J. Immunol. 163:1725-29.
- 10 [51] Kwok et al. (2001) Trends Immunol 22:583-88.
- [52] Brusica et al. (1998) Bioinformatics 14(2):121-30
- [53] Meister et al. (1995) Vaccine 13(6):581-91.
- [54] Roberts et al. (1996) AIDS Res Hum Retroviruses 12(7):593-610.
- [55] Maksyutov & Zagrebelnaya (1993) Comput Appl Biosci 9(3):291-7.
- 15 [56] Feller & de la Cruz (1991) Nature 349(6311):720-1.
- [57] Hopp (1993) Peptide Research 6:183-190.
- [58] Welling et al. (1985) FABS Lett. 188:215-218.
- [59] Davenport et al. (1995) Immunogenetics 42:392-297.
- [60] Tsurui & Takahashi (2007) J Pharmacol Sci. 105(4):299-316.
- 20 [61] Tong et al. (2007) Brief Bioinform. 8(2):96-108.
- [62] Schirle et al. (2001) J Immunol Methods. 257(1-2):1-16.
- [63] Chen et al. (2007) Amino Acids 33(3):423-8.
- [64] Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel et al., eds., 1987) Supplement 30
- [65] Smith & Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482-489.
- 25 [66] WO00/66741.
- [67] WO99/57280
- [68] Serruto et al. (2010) PNAS USA 107:3770-5.
- [69] Massignani et al. (2003) J Exp Med 197:789-799.
- [70] Welsch et al. (2004) J Immunol 172:5605-15.
- 30 [71] Hou et al. (2005) J Infect Dis 192(4):580-90.
- [72] WO03/063766.
- [73] Fletcher et al. (2004) Infect Immun 72:2088-2100.
- [74] Zhu et al. (2005) Infect Immun 73(10):6838-45.
- [75] Cantini et al. (2006) J. Biol. Chem. 281:7220-7227
- 35 [76] WO2004/048404
- [77] WO2009/104097.
- [78] Wang et al. (2000) J. Immunol. Meth. 233:167-77.

REIVINDICACIONES

1. Un ensayo de unión para el análisis *in vitro* de una muestra de vacuna que contiene proteína meningocócica de un lote de vacuna final en la forma en que se liberaría al público, que comprende los pasos de:
 - 5 (i) permitir que un inmunógeno de proteína meningocócica dentro de la vacuna muestra interaccione con un anticuerpo monoclonal que (a) es bactericida para meningococo o (b) reconoce a un epítoto conformacional en el inmunógeno meningocócico; entonces
 - (ii) medir la interacción entre el inmunógeno meningocócico y el anticuerpo del paso (i),
 en el que el ensayo de unión es un ELISA,

 en el que la muestra se analiza en la forma en la que se toma del lote, ya sea a plena potencia o después de la dilución,

 en el que la vacuna incluye a el antígeno meningocócico pufH, y

 en el que el anticuerpo monoclonal utilizado en el paso (i) que reconoce el antígeno meningocócico pufH se selecciona de:
 - 15 12C1/D7, cuya región V_L tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y cuya región V_P tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22;
 - 11F10/G6, cuya región V_L tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y cuya región V_P tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24;
 - 30G11/H3, cuya región V_L tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 y cuya región V_P tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26; y
 - 20 14B3/D4, cuya región V_L tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 y cuya región V_P tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28.
2. El ensayo de la reivindicación 1, en el que la medición en el paso (ii) indica cuantitativamente la concentración del epítoto diana del anticuerpo monoclonal dentro de la vacuna muestra.
3. El ensayo de cualquier reivindicación precedente, en el que el ensayo de unión es un ELISA competitivo.
- 25 4. El ensayo de la reivindicación 3, en el que: el paso (i) implica incubar a la vacuna muestra con el anticuerpo monoclonal para que se puedan formar complejos entre el anticuerpo y los inmunógenos meningocócicos en la muestra; estos complejos se agregan a un recipiente en el que los antígenos competidores están inmovilizados, en el que los antígenos competidores pueden unirse a el anticuerpo monoclonal; y luego determinar en el paso (ii) la cantidad de anticuerpo monoclonal que se une a los antígenos competidores.
- 30 5. El ensayo de cualquier reivindicación precedente, en el cual el paso (ii) utiliza un anticuerpo secundario marcado con una enzima.
6. El ensayo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la vacuna incluye más de un inmunógeno meningocócico.
- 35 7. El ensayo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la vacuna incluye además antígenos meningocócicos de AUHN y/o AdAN, y en el que el anticuerpo monoclonal utilizado en la etapa (i) reconoce a el antígeno meningocócico AUHN o AdAN.
8. El ensayo de cualquier reivindicación precedente, en el que la vacuna incluye además una vesícula meningocócica.
- 40 9. El ensayo de cualquier reivindicación precedente, en el que la vacuna incluye además un inmunógeno meningocócico adsorbido.
10. Un procedimiento para el análisis *in vitro* de una muestra de prueba de una vacuna que contiene proteínas meningocócicas, que comprende los pasos de:
 - 45 (i) realizar el ensayo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en la vacuna muestra de prueba y, opcionalmente, en al menos una dilución de la muestra de prueba;
 - (ii) realizar el ensayo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en una muestra de vacuna estándar de potencia *in vivo* conocida y, opcionalmente, en al menos una dilución de la vacuna muestra estándar; y

ES 2 750 366 T3

(iii) comparar los resultados de los pasos (i) y (ii) para determinar la potencia de los inmunógenos en la vacuna de prueba en relación con la potencia de los inmunógenos en la vacuna estándar.

Figura 1

Figura 1A

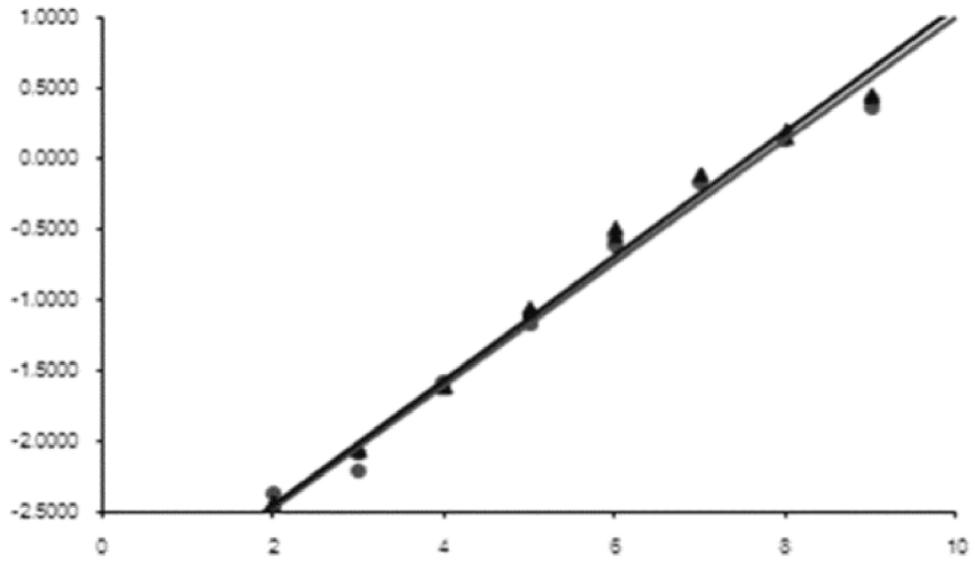


Figura 1B

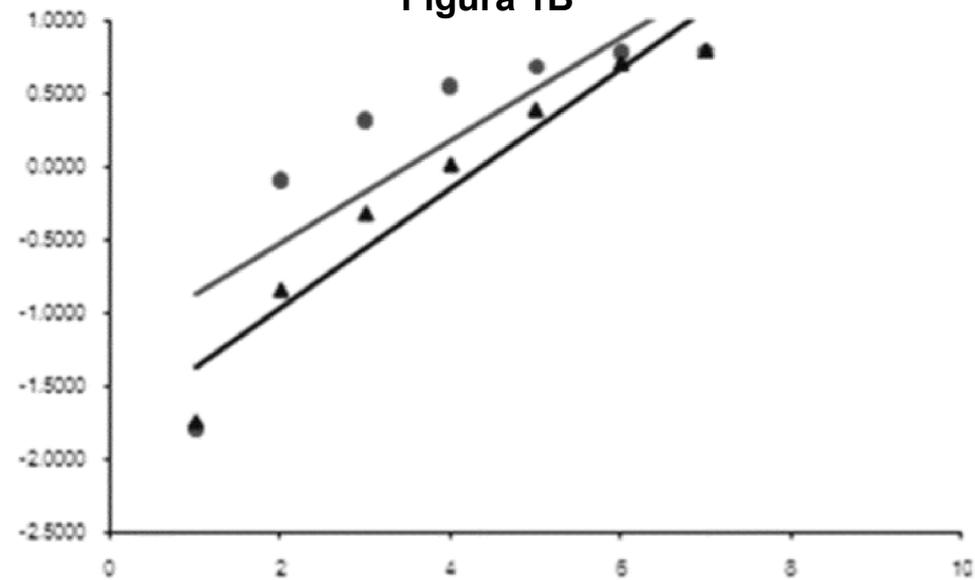


Figura 1C

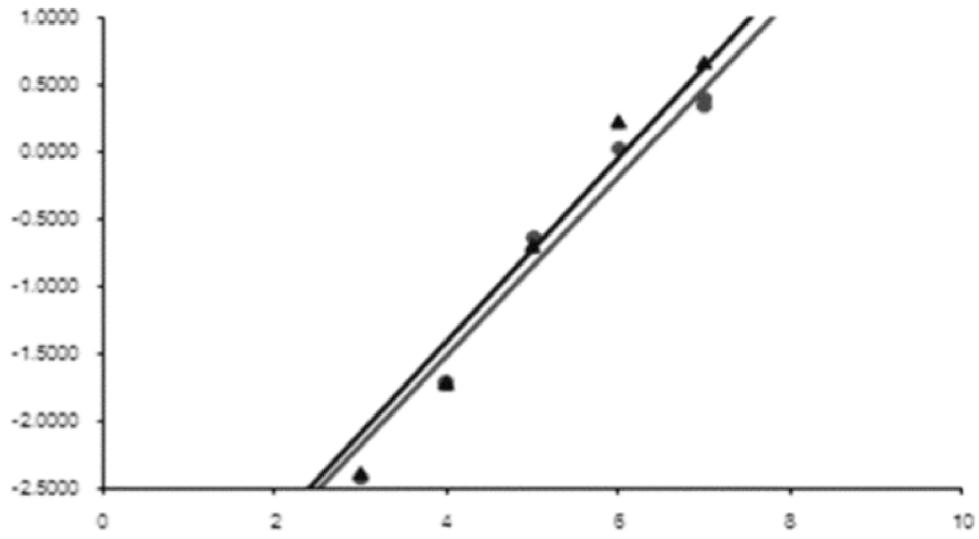


Figura 1D

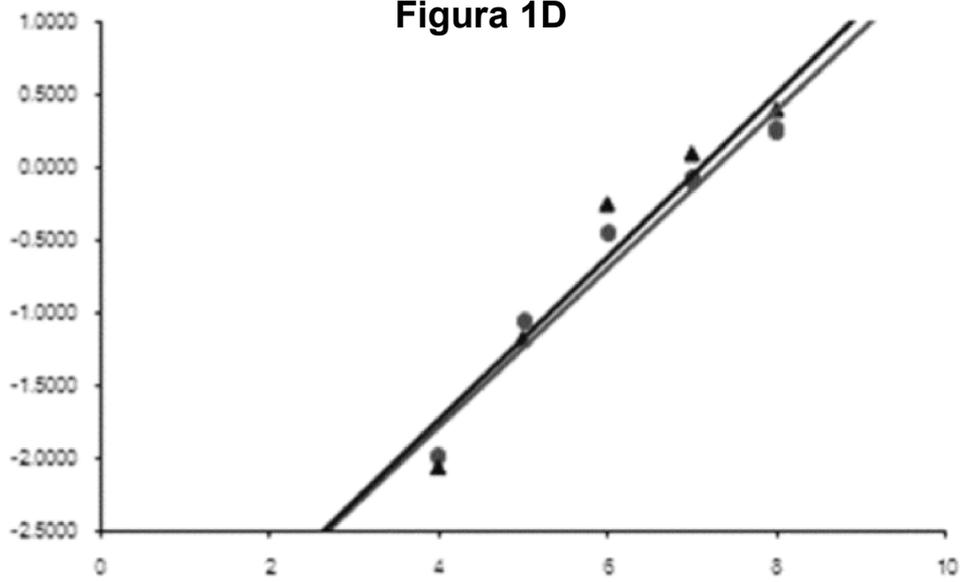


Figura 1E

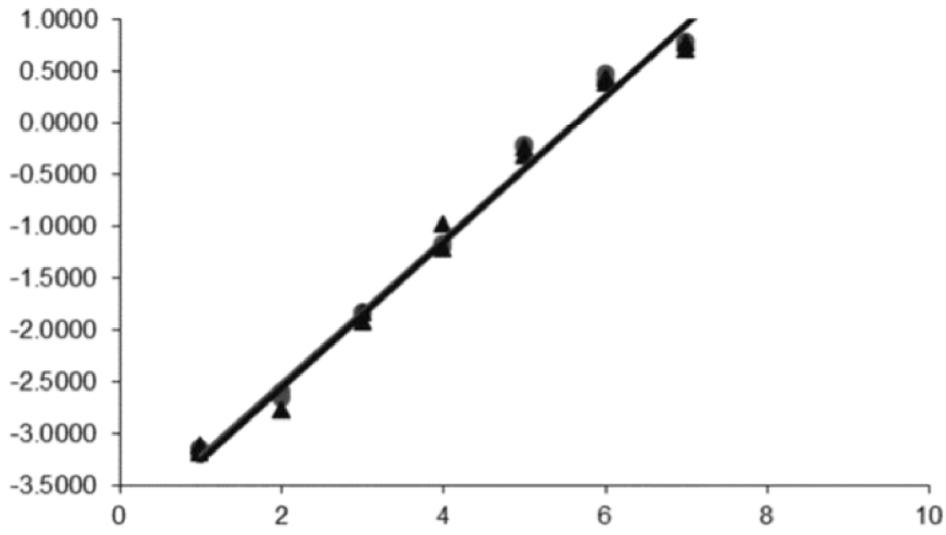


Figura 1F

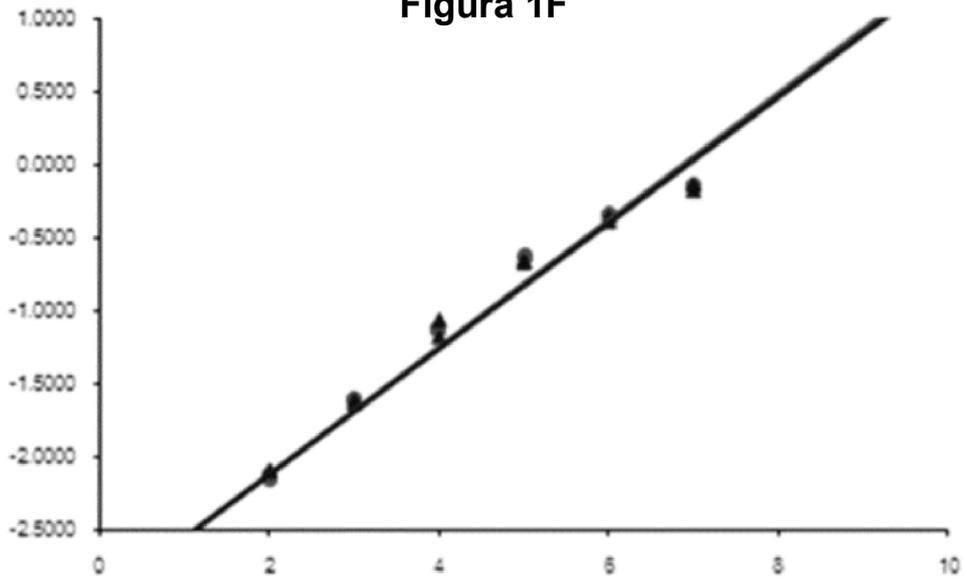


Figura 2

Figura 2A

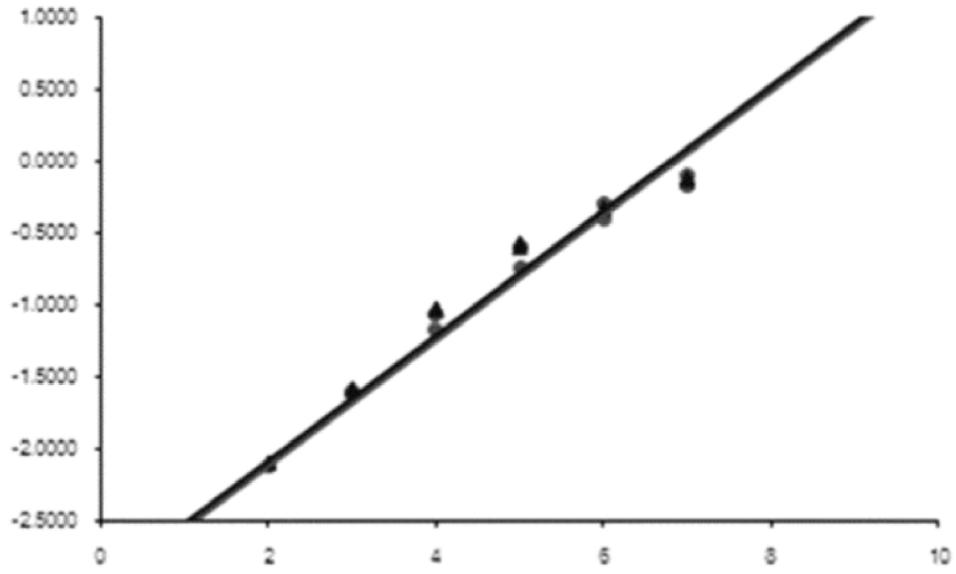


Figura 2B

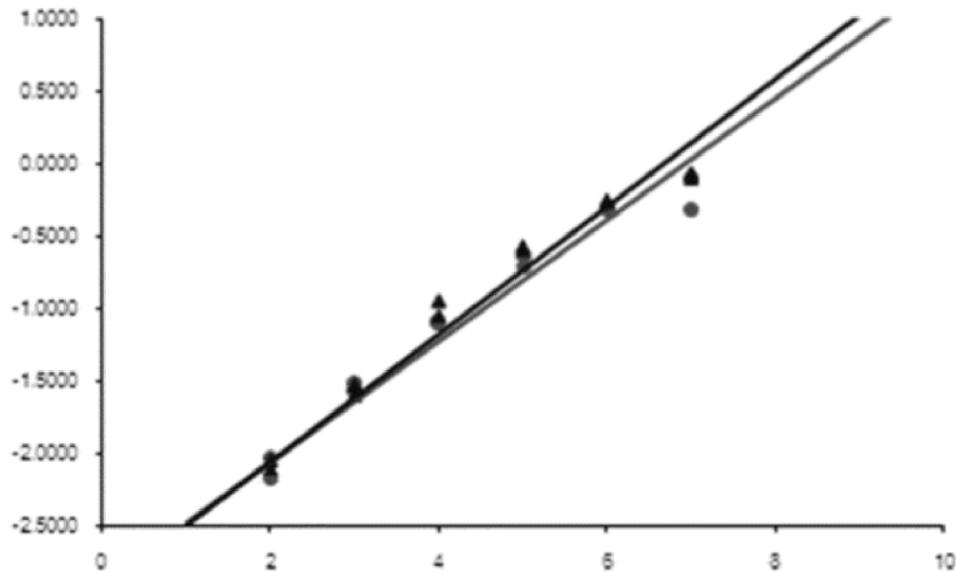


Figura 3

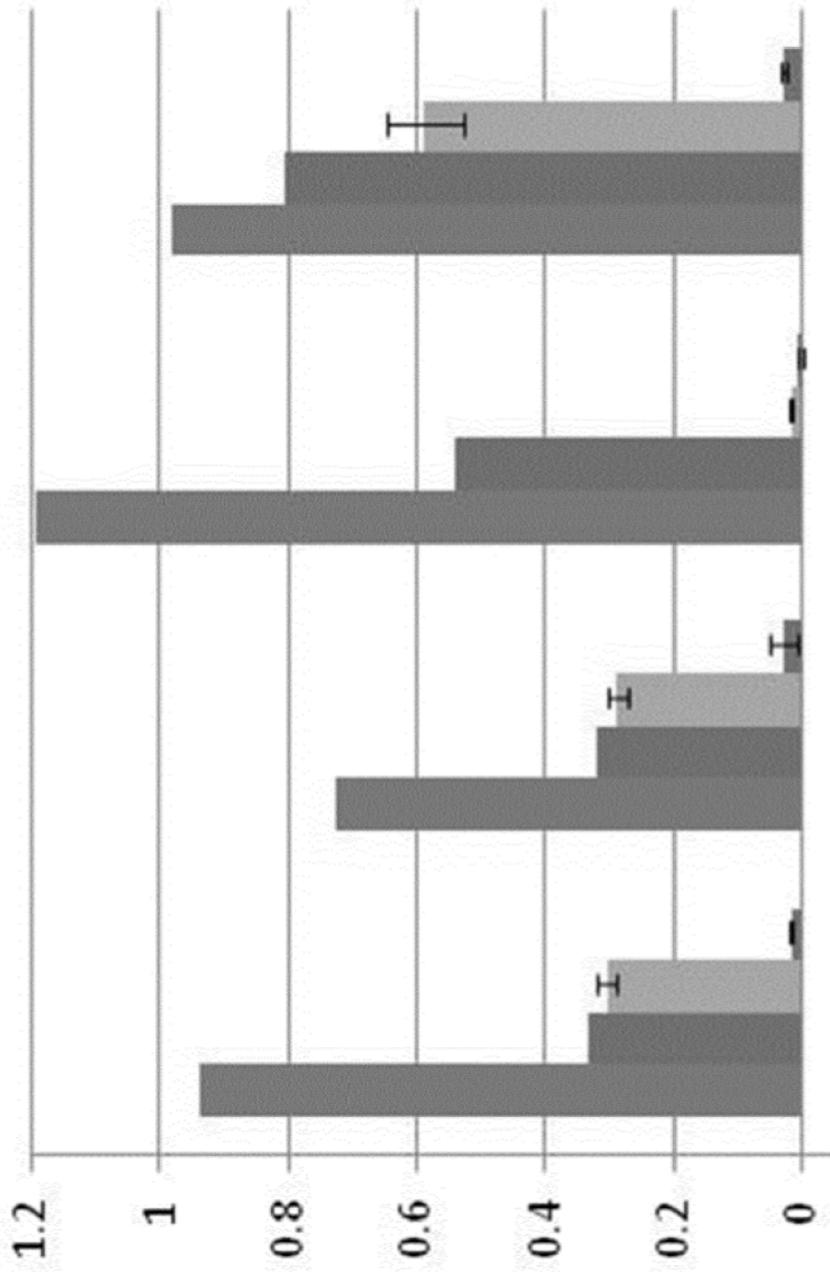


Figura 4

Figura 4A

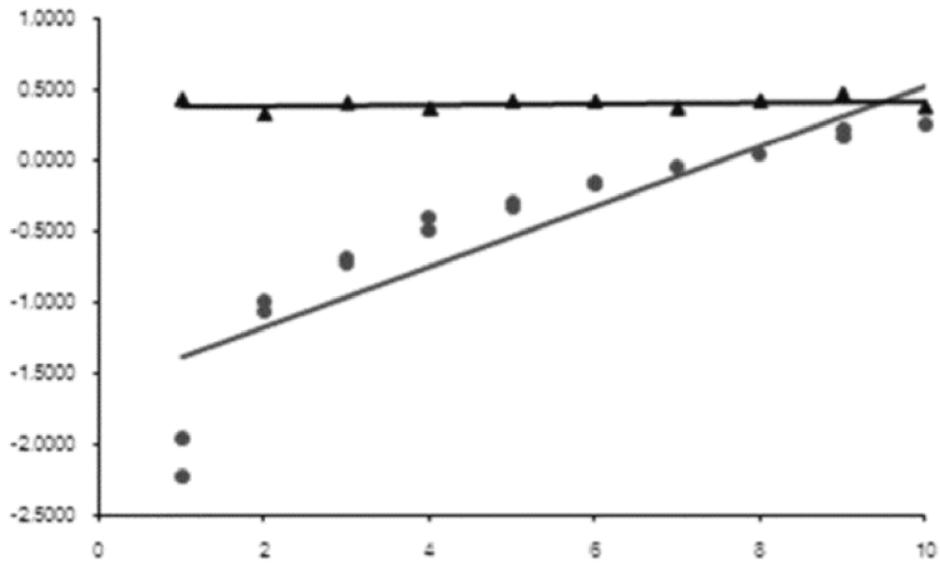


Figura 4B

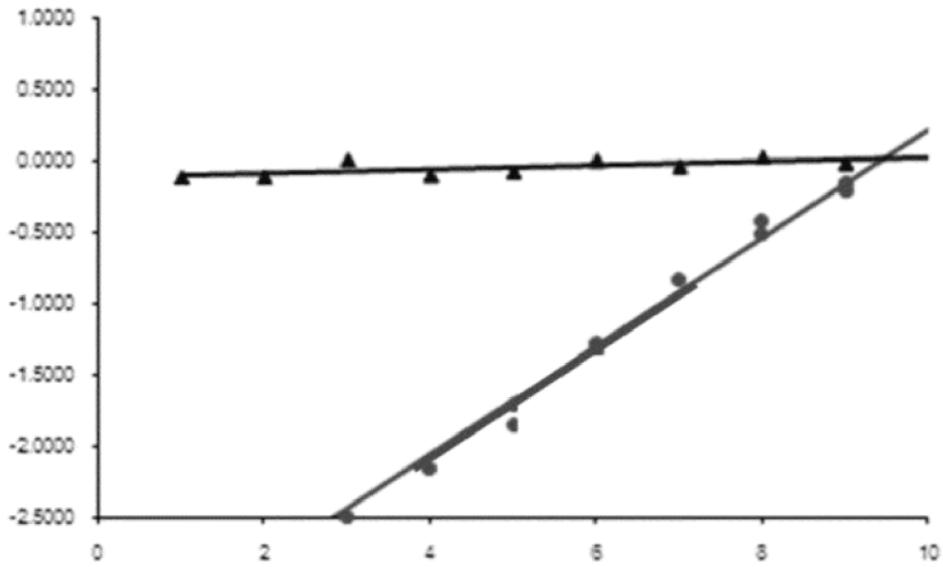


Figura 4C

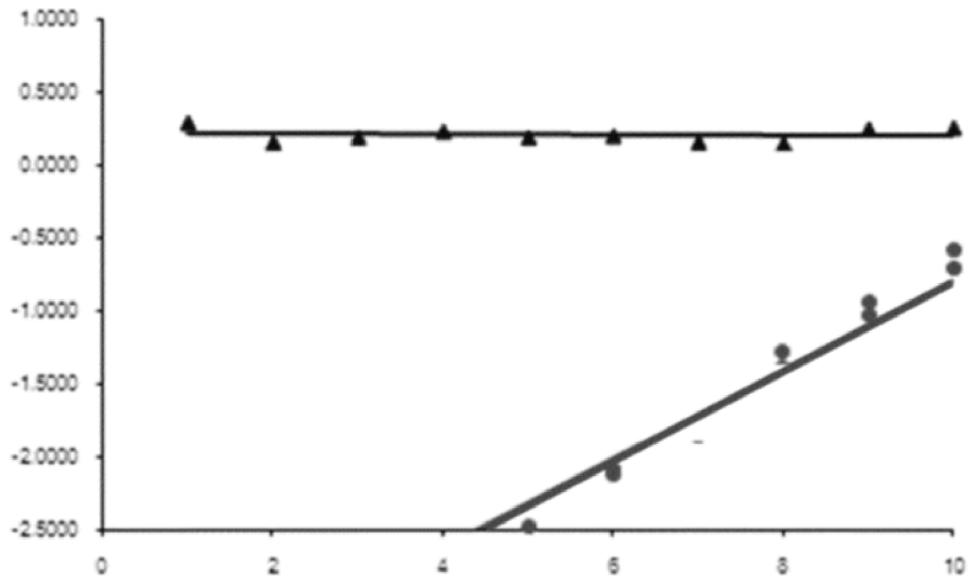


Figura 4D

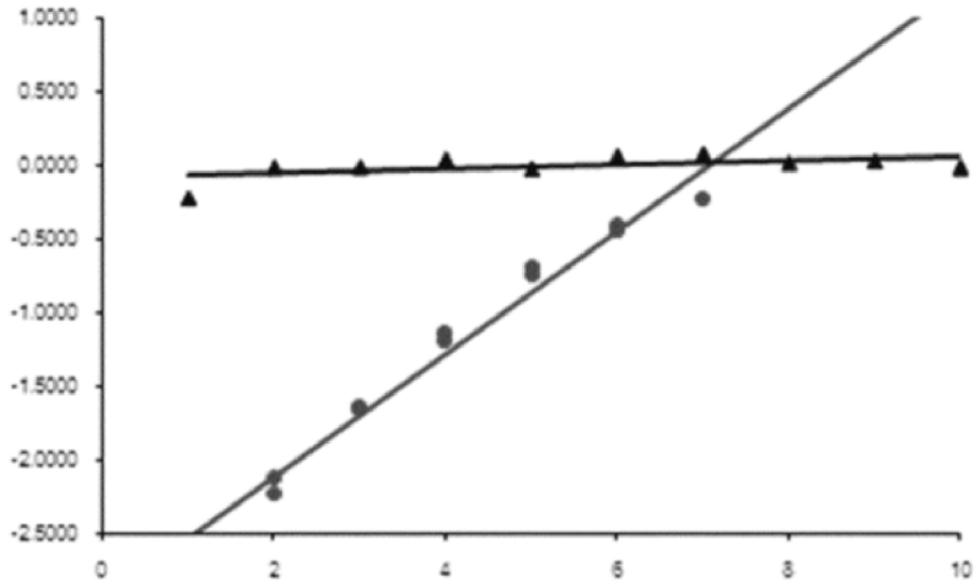


Figura 5

