(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 236 683**

(51) Int. CI.:
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA T5

(96) Número de solicitud europea: **93114884 .5**
(96) Fecha de presentación: **16.09.1993**
(97) Número de publicación de la solicitud: **0589348**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **30.03.1994**

(54) Título: **Procedimiento para la cuantificación inmunoquímica de antígenos inmunorreactivos inactivados**

(30) Prioridad:
25.09.1992 DE 4232073

(45) Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **16.07.2005**

(45) Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **16.08.2012**

(45) Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **16.08.2012**

(73) Titular/es:
NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS GMBH
EMIL-VON-BEHRING-STRASSE 76
35041 MARBURG, DE

(72) Inventor/es:
Gröner, Albrecht y
Diderrich, Gaston

(74) Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 236 683 T5

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la cuantificación inmunoquímica de antígenos inmunorreactivos inactivados.

La invención se refiere a un procedimiento para la cuantificación inmunoquímica de antígenos inmunorreactivos inactivados, que se usan para provocar una respuesta inmune en mamíferos y seres humanos.

Las vacunas contra enfermedades que son originadas por virus o microorganismos contienen una cantidad determinada de antígeno, cuya administración conduce a una respuesta inmune en el animal o en el ser humano vacunado. Como esta respuesta inmune depende de la dosis, en una vacuna es condición previa una determinada cantidad de antígeno para su eficacia. Hasta ahora, habitualmente, se efectúa la comprobación del contenido de antígeno en la vacuna en ensayos de protección *in vivo* y en el futuro, cada vez más, en procedimientos *in vitro;* el contenido de antígeno se cuantifica durante la producción, preferentemente, mediante determinación de proteínas, determinación del número de gérmenes/partículas o por reacción de inmunoprecipitación para mezclar/ajustar la vacuna.

En el sentido de esta invención, microorganismos son microorganismos patógenos y virus, contra cuya patogenicidad en mamíferos y seres humanos puede lograrse una inmunidad parcial o total mediante la vacunación con componentes de microorganismos o virus inactivados o microorganismos o virus enteros inactivados. La vacuna es eficaz por su contenido en determinadas estructuras antigénicas.

Por ello, la comprobación de estos antígenos en una vacuna, en particular, si fue tratada por agentes inactivantes apropiados, y la determinación cuantitativa de estos antígenos mediante procedimientos inmunológicos indica la eficacia de la vacuna.

Así, por ejemplo, debido a reglamentos legales y similares, por ejemplo, dictámenes CPMP, debe determinarse en el envase definitivo la cantidad de hemaglutinina en una vacuna contra la gripe, que normalmente está compuesta por tres diferentes cepas de virus de la gripe, mediante un ensayo de inmunodifusión o mediante otro procedimiento apropiado (dictamen CPMP). El ensayo de inmunodifusión se usa generalmente como “Técnica de inmunodifusión radial simple” (SRD) (G. C. SCHILD y col. (1975), “A single-radial-inmuno-diffusion technique for the assay of haemagglutinin. Proposals for an assay method for the haemagglutinin content of influenza vaccines”, Boletín de la Organización Mundial de la Salud 53, 223-231.).

Se demostró ahora que algunas vacunas de la gripe, evidentemente debido a la forma física de la hemaglutinina, grandes complejos moleculares que se forman durante la escisión de los virus mediante disolventes lipídicos y la subsiguiente inactivación mediante formaldehído, no pueden ser analizados en el ensayo SRD (GANDHI, S.S. (1978), “The effect of formaldehyde treatment of influenza virus on the assay of its haemagglutinin antigen content by the single-radial-immunodiffusion (SRD) technique”, J. Biological Standardization 6, 121-126). Puede ser una explicación, que los grandes complejos moleculares en la agarosa se difunden menos que moléculas menores y así simulan un contenido menor de antígeno.

Pero antígenos de otras vacunas contra enfermedades causadas por virus o microorganismos frecuentemente tampoco pueden cuantificarse, o no pueden cuantificarse de forma exacta, mediante los procedimientos conocidos hasta ahora. Por tanto, la invención se basa en el objetivo de encontrar un procedimiento de cuantificación que, independientemente de los procedimientos usados para la inactivación de la vacuna, de forma segura y fiable proporcione resultados de mediciones comparables con patrones primarios como, por ejemplo, los reactivos NIBSC del Instituto Nacional de Patrones y Control Biológicos (por encargo de la OMS).

Sorprendentemente, se demuestra ahora que se alcanza el objetivo planteado mediante un procedimiento de comprobación en el que el antígeno (los antígenos) que se ha(n) de comprobar se fijan(n) por adsorción a una fase sólida y la parte del antígeno fijado se determina mediante uno o varios anticuerpos marcados directa o indirectamente.

En J. Immunol. (1980) 125 1583-1588 se describe un procedimiento para la identificación de determinantes de antígenos del virus de la gripe HA. En D11 se escinde HA con bromocianógeno y se evalúa la capacidad del fragmento de interactuar con anticuerpos generados contra virus de la gripe purificados. La escisión de HA con bromocianógeno no conduce a la formación de complejos moleculares de hemaglutinina.

En Acta. Virology (1978) 22 371-382 se evalúa la capacidad de suero de conejos producido contra virus intacto de la gripe o HA purificada, de interactuar con HA1 y HA2 purificadas. La HA1 y HA2 purificadas se preparan mediante filtración en gel de HA purificada en guanidina 6 M. Este documento describe que los sueros interactúan tanto con HA1 como con HA2. HA1 y HA2 unívocamente son subunidades de HA y no complejos moleculares de HA.

En Immunology and Cell Biology (1992) 70 181-191 se evalúa la eficacia de transferencias Western para la comprobación de reacciones de anticuerpos en el ratón y en el ser humano contra las proteínas de viriones de la gripe HA1, HA2 y HA no escindida. Se prepararon las proteínas a partir de virus purificado mediante mezclado con SDS para la electroforesis en condiciones reductoras y no reductoras, y mediante ebullición de 2 minutos de

duración. La inactivación con SDS no conduce a complejos moleculares de hemaglutinina.

En Vopr. Virusol. (1985) 30 672-675 se describe un sistema de ensayo para la comprobación y la determinación cuantitativa de hemaglutinina de virus de la gripe (HA) en muestras biológicas, mediante un inmunoensayo de enzima en fase sólida. Se liga el antígeno que contiene HA de forma inmunoquímica a una matriz de poliestireno.

En Biological (1990) 18 321-330 se describe un procedimiento para determinar el grado antigénico de una vacuna contra la rabia, mediante la determinación cuantitativa de la gluco-proteína similar a la hemaglutinina que contiene éste. Se inactiva el virus con BPL, un procedimiento de inactivación que no conduce a la formación de complejos moleculares de hemaglutinina.

Arch. Virol. (1989) 108 169-182 describe una comprobación inmunológica de hemaglutininas de la gripe reticuladas mediante formaldehído mediante una transferencia Western de PAGE con anticuerpos policlonales específicos de HA1 y HA2.

Por ello, el objeto de esta invención es un procedimiento para la cuantificación inmunoquímica de complejos moleculares de hemaglutinina inmunorreactivos inactivados de virus de la gripe, que comprende los siguientes pasos:

a) se incuba una muestra que contiene uno o varios complejos moleculares de hemaglutinina que se han de determinar, que se formaron durante la escisión de los virus mediante disolventes lipídicos y la subsiguiente inactivación con formaldehído, con una fase sólida que fija proteínas, adsorbiéndose el complejo molecular de hemaglutinina a esta fase sólida de forma física y no fijándose por reacción inmunoquímica,

b) se separan la fase líquida y la fase sólida,

c) se incuba el complejo molecular de hemaglutinina adsorbido con uno o varios anticuerpos específicos que portan directa o indirectamente un marcaje,

d) se determina la cantidad de marcaje unida al complejo molecular de hemaglutinina, y

e) a partir de la cantidad de marcaje unida, por comparación con uno o varios valores patrón se determina la cantidad del complejo molecular de hemaglutinina inmunorreactivo.

Aquí se prefiere un procedimiento de este tipo en el que se comprueban antígenos de un virus de la gripe mediante la reacción con un anticuerpo policlonal o uno monoclonal, o una mezcla de anticuerpos monoclonales que portan el mismo marcaje.

Además, se prefiere un procedimiento de este tipo en el que pueden detectarse antígenos de un virus de la gripe mediante una reacción con anticuerpos policlonales o monoclonales específicos, en una mezcla de diferentes microorganismos o virus.

También se prefiere un procedimiento de este tipo en el que pueden comprobarse por separado antígenos de diferentes microorganismos o virus mediante una reacción con diferentes anticuerpos policlonales o monoclonales que correspondientemente a su especificidad por los antígenos de diferentes microorganismos, portan diferentes marcajes.

Aquí se prefiere muy en particular un procedimiento en el que la fase sólida es una placa de microtitulación.

También es de muy especial preferencia un procedimiento en el que la fase sólida es una membrana de nilón o de nitrocelulosa, preferentemente, de nitrocelulosa.

Por el uso de sueros policlonales contra, en lo posible, todos los antígenos/epítopos del principio activo en la vacuna o de anticuerpos policlonales o monoclonales específicos contra determinados antígenos/epítopos, por ejemplo, pueden diferenciarse cuantitativamente determinados antígenos de un virus o determinados microorganismos en una mezcla (vacunas combinadas), o la proporción del portador de una vacuna de conjugado de polisacáridos.

Para realizar el procedimiento conforme a la invención, se disuelven, por ejemplo, el antígeno de referencia y el antígeno muestra en un disolvente acuoso conocido por el experto como, por ejemplo, solución tamponada o no tamponada que contiene una sal neutra, preferentemente, solución isotónica de NaCl preferentemente tamponada que también puede contener un detergente, y se pone en contacto con una matriz portadora que puede adsorber antígenos de forma física; aquí se prefieren aquellas fases sólidas que están compuestas por poliestireno, nilón o nitrato de celulosa. La forma de la fase sólida puede variar en amplios intervalos, se prefieren fases en partículas, membranas y placas de microtitulación. En forma ventajosa, pueden magnetizarse las fases en partículas. Se prefiere el uso de membranas de nilón o nitrocelulosa.

Adsorción física, en el sentido de la presente invención, significa que la unión no se efectúa mediante reacción

inmunoquímica, sino, por ejemplo, mediante aquellas fuerzas que el experto conoce como fuerzas de van der Waal o enlaces por puentes de hidrógeno.

Antígenos de referencia y antígenos muestra se administran en grados de dilución en un factor de 1,1 a 20, preferentemente, de 1,2 a 8 y, en particular, de 1,5 a 3, no debiendo superar la concentración de (proteína) del antígeno que se ha de comprobar los 5 µg, preferentemente, administrarse en cantidad de 0,2 a 0,01 µg al principio de la serie de diluciones. El antígeno reacciona con un antisuero específico, IgG o IgM purificados o anticuerpos monoclonales, en diluciones de trabajo de, por ejemplo, 1:50 hasta 1:50000, dependiendo de la concentración de las inmunoglobulinas de la preparación de suero. Estos anticuerpos pueden conjugarse mediante reacciones en sí conocidas por el experto, con un marcaje detectable. En un procedimiento preferido, a su vez, se comprueban estos anticuerpos específicos con un segundo anticuerpo conjugado con un marcaje detectable, en diluciones de trabajo conocidas por el experto para tales determinaciones.

Tales marcajes detectables son en sí conocidas por el experto; a ellos pertenecen, por ejemplo, enzimas y grupos fluorescentes y quimioluminiscentes.

Se prefiere, en particular, en conexión con el uso de partículas magnéticas, el uso de un marcaje quimioluminiscente.

Se mide la señal obtenida mediante la detección del marcaje mediante procedimientos conocidos por el experto; por comparación con el antígeno de referencia se determina el contenido de antígeno de la muestra. Pueden minimizarse reacciones no específicas del primer anticuerpo con proteínas acompañantes no deseadas en la muestra, por ejemplo, por incubación de este anticuerpo con estas proteínas acompañantes; esta reacción sérica no deseada puede producirse cuando, por ejemplo, el primer anticuerpo fue inducido por un antígeno que fue preparado de manera idéntica o muy similar a la preparación del antígeno en la muestra, es decir, si es factible, es preferible un sistema heterólogo de producción del antígeno para el primer anticuerpo.

El Begrivac® (Behringwerke AG, Marburg, Alemania) usado en los ejemplos contiene respectivamente tres cepas de virus de la gripe recomendadas por la OMS, la vacuna de 1991 contiene las cepas A/Singapur, A/Beijing.y B/Yamagata. El contenido de antígeno fue ajustado respectivamente en 34 µg de hemaglutinina de las 3 cepas/ml de dosis de vacuna, basado en el ensayo SRD en material viral no inactivado. La figura 4 muestra los resultados del ensayo SRD y del procedimiento conforme a la invención para el contenido de antígeno en la vacuna (inactivada).

Los siguientes ejemplos ilustran la invención pero no la limitan de ninguna manera.

Ejemplo 1

Determinación de la hemaglutinina (HA) en vacunas comerciales mediante inmunohibridación por puntos

Material

Begrivac® 91 y Begrivac® 92 (la vacuna que se ha de examinar) (Behringwerke AG)

Antígenos de referencia del Instituto Nacional de Control y Estandarización Biológicos, Potters Bar, Reino Unido.

Antisueros de referencia del Instituto Nacional de Control y Estandarización Biológicos, Potters Bar, Reino Unido

Membranas para transferencia (por ejemplo, nitrato de celulosa (SCHLEICHER & SCHUELL, Dassel, Alemania) BA 85/0,45 µm o membrana de nilón (Millipore, Eschborn, Alemania) Membrana Immobilon [PVDF (poli(fluoruro de vinilideno))], IPUH 00010/0,45 µm).

Se diluyen antígenos de referencia de las 3 cepas de virus de la gripe hasta 34 µl de HA/ml, tanto para cada cepa por separado, como para la mezcla de las cepas, como combinación trivalente.

Por triplicado, se colocan en una placa de microtitulación los antígenos de referencia y la combinación, así como las vacunas contra la la gripe, en series de dilución geométrica (dilución 1:20; factor de la serie de diluciones: 2; tampón de dilución Tris 25 mM/glicina 192 mM).

Se arma el dispositivo para la transferencia (por ejemplo, Schleicher & Schuell) según las instrucciones de trabajo del fabricante.

En cada pocillo del dispositivo para la transferencia se pipetean 100 µl de tampón diluyente. Después de evaporar mediante vacío, en cada pocillo del dispositivo para la transferencia se transfieren 100 µl de las diluciones de muestras desde la placa de microtitulación, se evapora mediante vacío; el antígeno se fija a la membrana.

Se incuba la membrana durante 2 h a temperatura ambiente en 30 ml de solución al 3% de leche desnatada en PBS (para bloquear la capacidad de la membrana de fijar proteínas).

El antisuero de referencia (primer anticuerpo contra HA) se diluye en 30 ml de solución al 0,5% de ovo-albúmina en PBS (PBS sin Ca^{2+}/Mg^{2+}) con 5% de líquido alantoico de huevos sanos de gallina; para la determinación de A/Singapur: dilución de trabajo: 1:20000; de A/Beijing: dilución de trabajo: 1:15000; de B/Yamagata: dilución de trabajo: 1:32000, y se incuba la membrana en esta solución durante la noche a temperatura ambiente sobre una mesa basculante.

Lavado de la membrana

- durante 30 min en PBS con tritón X 100 al 0,1%
- durante 5 min en PBS con NaCl 1M
- durante 30 min en PBS con tritón X 100 al 0,1%

Se diluye la membrana al 1:2500 con el segundo anticuerpo (anti-Sheep-POD (Sigma Chemie, Deisenhofen, Alemania; número de pedido: A. 3415)) en 30 ml de solución al 0,5% de leche desnatada en PBS y se incuba durante 2 h a temperatura ambiente.

Lavado de la membrana como está descrito anteriormente

Se incuba la membrana en 30 ml de solución colorante (3 ml de 4-cloro-1-naftol (3 mg/ml de etanol/15 ml de tris/ClH 50 mM, pH 7,6/12 ml de PBS/15 µl de H_2O_2) durante 10 min a temperatura ambiente en la oscuridad.

Después del teñido, se lava la membrana varias veces con agua destilada.

Para la determinación cuantitativa, se analizan las manchas con un de láser (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, EE.UU., software: protein + dna imageware, pdi, Huntington Station, NY, EE.UU.). Se representan gráficamente los valores medios de la intensidad de color/punto (densidad óptica/superficie) de las determinaciones múltiples, para referencia y muestra. Mediante un software de ELISA, realizando cortes en el intervalo de trabajo, se determina el contenido de HA de las muestras en comparación con la referencia (figuras 1 y 2).

Ejemplo 2:

Determinación de la hemaglutinina (HA) en vacunas comerciales, mediante ELISA:

Material:

Material de referencia y de muestras como en el ejemplo 1

Placas de microtitulación para ELISA (por ejemplo, Greiner, Frickenhausen, Alemania)

Se diluyen antígenos de referencia de las 3 cepas de virus de la gripe a 34 µl de HA/ml, tanto para cada cepa individual, como para la mezcla de las cepas como combinación trivalente.

Se colocan por duplicado respectivamente 100 µl de antígenos de referencia y de la combinación, así como de vacunas contra la gripe, en una placa de microtitulación para ELISA, en series de diluciones geométricas (dilución 1:100; factor de dilución: 2; tampón de dilución: Na_2CO_3 0,05 M, pH: 9,5). Se incuba la placa durante la noche a temperatura ambiente.

Se lava tres veces la placa con tampón lavador (polvo de leche desnatada al 0,5% y Tween 20 al 0,05% en PBS, pH: 7,2) y en cada pocillo de la placa de microtitulación se adicionan 100 µl del primer anticuerpo (Anti/Singapur), diluido al 1:5000 en tampón lavador con líquido alantoico al 5% de huevos sanos de gallina.

Después de incubar durante 1 h a temperatura ambiente, se lava 3 veces la placa con tampón lavador y se adiciona el segundo anticuerpo (anti-oveja POD, marcado; Sigma Chemie) (100 µl/pocillo, diluido al 1:2500 en tampón lavador).

Se lava la placa 4 veces con tampón lavador y luego se adicionan con pipeta 100 µl se solución de sustrato/pocillo (solución de sustrato: 150 mg de o-fenilendiamina en 100 ml de tampón de fosfato-citrato y 50 µl de H_2O_2).

Después de la incubación durante 30 min, a temperatura ambiente, en la oscuridad, se detiene la reacción mediante la adición de 100 µl de H_2SO_4 1M/pocillo. Se mide la intensidad de color en un lector ELISA apropiado y, dado el caso, se determina el contenido de HA con la ayuda de la referencia (figura 3).

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la cuantificación inmunoquímica de complejos moleculares de hemaglutinina inmunorreactivos inactivados de virus de la gripe, que comprende los siguientes pasos:

   a) se incuba una muestra que contiene uno o varios complejos moleculares de hemaglutinina que se han de determinar, que se formaron durante la escisión de los virus mediante disolventes lipídicos y la subsiguiente inactivación con formaldehído, con una fase sólida que fija proteínas, adsorbiéndose el complejo molecular de hemaglutinina a esta fase sólida de forma física y no fijándose por reacción inmunoquímica,

   b) se separan la fase líquida y la fase sólida,

   c) se incuba el complejo molecular de hemaglutinina adsorbido con uno o varios anticuerpos específicos que portan directamente o indirectamente un marcaje,

   d) se determina la cantidad de marcaje unida al complejo molecular de hemaglutinina, y

   e) a partir de la cantidad de marcaje unida, por comparación con uno o varios valores patrón, se determina la cantidad del complejo molecular de hemaglutinina inmunorreactivo.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la muestra contiene complejos moleculares de hemaglutinina de tres diferentes virus de la gripe.

3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que se comprueban los complejos moleculares de hemaglutinina de un virus de la gripe mediante la reacción con un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal, o una mezcla de anticuerpos monoclonales que portan el mismo marcaje.

4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que se comprueban los complejos moleculares de hemaglutinina mediante una reacción con anticuerpos específicos policlonales o monoclonales, en una mezcla de diferentes microorganismos o virus.

5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que se comprueban de forma separada complejos moleculares de hemaglutinina de diferentes virus de la gripe, mediante una reacción con diferentes anticuerpos policlonales o monoclonales, que de forma correspondiente a su especificidad por los complejos moleculares de hemaglutinina de diferentes virus de la gripe, portan diferentes marcajes.

6. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la fase sólida está compuesta por poliestireno, nilón o nitrocelulosa.

7. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la fase sólida se encuentra en partículas.

8. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la fase sólida es una placa de microtitulación.

9. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la fase sólida es una membrana de nilón o de nitrocelulosa, preferentemente, de nitrocelulosa.