

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 474**

51 Int. Cl.:

G01N 33/559 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.09.2010** **E 10757100 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2015** **EP 2480889**

54 Título: **Ensayo de inmunodifusión para el virus de la gripe**

30 Prioridad:

25.09.2009 US 245809 P

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

22.06.2015

73 Titular/es:

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (100.0%)
rue de l'Institut, 89
1330 Rixensart, BE

72 Inventor/es:

BARAS, BENOIT GUY JULES y
JACOB, VALERIE AUDRY MICHELINE

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 538 474 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 inmunodifusión para el virus de la gripe

Campo técnico La invención se refiere al campo de los ensayos realizados en preparaciones de virus y composiciones de vacuna, tales como composiciones que comprenden el virus de la gripe. En particular, la invención se refiere a la determinación de la concentración de antígeno en dichas preparaciones o composiciones, en particular, en forma de preparaciones y composiciones con adyuvante, tales como vacunas.

Antecedentes de la técnica

Los virus de la gripe son uno de los virus más ubicuos presentes en el mundo, que afecta tanto a los seres humanos como al ganado. La gripe da como resultado una carga económica, morbilidad e incluso mortalidad significativas. Los virus de la gripe causan epidemias casi todos los inviernos, con tasas de infección por virus de hasta el 40 % en un periodo de seis semanas. La infección de la gripe tiene como resultado varios estados patológicos, desde una infección subclínica, pasando por una infección leve de las vías respiratorias superiores hasta una neumonía viral grave. Las epidemias de gripe típicas causan aumentos en la incidencia de neumonía y de enfermedades de las vías respiratorias inferiores como lo demuestra el aumento de las tasas de hospitalización o mortalidad.

La vacunación juega un papel fundamental en el control de las epidemias anuales de gripe. Actualmente las vacunas antigripales disponibles están inactivadas o son vacunas vivas atenuadas del virus de la gripe.

Si bien la gran mayoría de las vacunas antigripales actuales, para la gripe estacional, son vacunas sin adyuvante, otros enfoques, como para las vacunas pandémicas dependen de la adyuvación para poder ser capaces de disminuir el contenido de antígeno (ahorro de antígeno) y aumentar así el número de dosis de vacuna disponibles. El uso de un adyuvante también puede ser útil para superar la potencial inmunogenicidad débil del antígeno en sujetos específicos, tales como en una población de individuos no tratados previamente o inmuno-comprometidos. A modo de ejemplos, se pueden citar los virus de la gripe con adyuvante de sal de aluminio, tales como hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio, o con emulsión de aceite en agua. Está comercializada una vacuna antigripal de tipo sub-unidad con adyuvante con la emulsión de aceite en agua MF59.

Un ensayo clásico para estandarizar el contenido de antígeno de las vacunas antigripales es el ensayo de inmunodifusión radial simple (SRID) (J.M. Wood y col.: An improved single radial immunodiffusion technique for the assay of influenza haemagglutinin antigen: adaptation for potency determination of inactivated whole virus and subunit vaccines. J. Biol. Stand. 5 (1977) 237-247; J. M. Wood y col., International collaborative study of single radial diffusion and immunoelectrophoresis techniques for the assay of haemagglutinin antigen of influenza virus. J. Biol. Stand. 9 (1981) 317-330), que fue recomendado por la OMS en 1978 para sustituir a las pruebas basadas en la aglutinación de los eritrocitos. El ensayo se basa en la inmunodifusión de los antígenos del virus de la gripe, tales como el antígeno hemagglutina (HA), en un gel de agarosa que contiene suero anti-HA específico, durante el cual se formarán complejos antígeno-anticuerpo dentro del gel. El antígeno HA se difunde radialmente desde los pocillos y reacciona con anticuerpos específicos, produciendo una zona de opalescencia en el gel, generalmente en forma de un anillo. El área de la zona de reacción que rodea los pocillos que contienen antígeno es una estimación de la cantidad de antígeno añadido al pocillo. Tras la tinción del gel, se mide la superficie de estos anillos y el contenido de antígeno de una preparación de virus de un cierto subtipo se calcula utilizando una curva de calibración obtenida con un lote de referencia de antígeno de este subtipo con un contenido en HA conocido.

Sin embargo, un ensayo de este tipo puede no ser adecuado para cualquier tipo de preparaciones o composiciones del virus de la gripe, en particular, para las preparaciones con adyuvante, ya que la presencia de adyuvante puede interferir con la prueba normal.

Por lo tanto, hay una necesidad de proporcionar mejoras en el ensayo SRID con el fin de ampliar su aplicabilidad y, en particular, para que sea adecuado para las preparaciones o composiciones con adyuvantes, tales como vacunas con adyuvante.

El documento WO 2009/081172 desvela un protocolo modificado de ensayo SRID para la gripe para un antígeno adsorbido en adyuvante, en particular, para las vacunas con adyuvante de sal de aluminio, que incluye una etapa adicional en la que el antígeno se desorbe del adyuvante antes de la difusión.

Por lo tanto, todavía hay una necesidad de proporcionar un ensayo SRID modificado, en particular, adecuado para la evaluación de vacunas con adyuvante, que sea fácil y rápido de poner en práctica y aplicable para identificar y/o cuantificar antígenos, tales como HA, en cualquier tipo de preparación de virus, ya sea con adyuvante o no, incluyendo formulaciones de vacuna final.

Sumario de la invención

Por consiguiente, en un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para realizar un ensayo de inmunodifusión que comprende al menos las siguientes etapas de:

- (a) preparar una o más muestras de ensayo que comprenden un antígeno del virus de la gripe,
- (b) tratar las muestras de ensayo con al menos 10 % (p/v) de un detergente zwitteriónico,
- (c) aplicar las muestras tratadas a un gel que contiene un anticuerpo específico del antígeno del virus de gripe y
- (d) dejar que las muestras se difundan en el gel.

En un segundo aspecto, se proporciona un procedimiento para cuantificar la concentración de HA de una vacuna que comprende un antígeno del virus de la gripe que comprende al menos las siguientes etapas de:

- (i) tratar la vacuna, o una muestra de la misma, con al menos 10 % (p/v) de un detergente zwitteriónico,
- (ii) tratar las muestras de referencia que comprenden un antígeno del virus de la gripe de una concentración conocida con al menos 10 % (p/v) de un detergente zwitteriónico,
- (iii) aplicar la vacuna tratada, o una muestra de la misma, y las muestras de referencia tratadas a un gel que contiene un anticuerpo específico del antígeno del virus de la gripe,
- (iv) permitir que las muestras se difundan en el gel,
- (v) determinar una dimensión de los anillos de precipitación en el gel formados por la vacuna, o una muestra de la misma, y una dimensión de los anillos de precipitación formados por las muestras de referencia, y
- (vi) comparar entre sí las dimensiones determinadas en la etapa (v) y usar los resultados de la comparación para calcular la concentración de HA en la vacuna, o en una muestra de la misma, aplicada en la etapa (iii).

Descripción detallada

La presente invención se refiere a un procedimiento de inmunodifusión para la identificación de un antígeno de interés, tal como un antígeno viral y/o la determinación de la concentración del antígeno de interés dentro de una preparación o una composición, tal como una vacuna. En particular, el procedimiento de la invención proporciona un ensayo SRID modificado que no sólo es adecuado para preparaciones de virus sin adyuvante, sino especialmente también para preparaciones con adyuvante, en particular, vacunas de la gripe con adyuvante emulsión de aceite en agua.

Los inventores, sorprendentemente, han observado que un adyuvante, en particular, una emulsión de aceite en agua, cuando está presente en una muestra que comprende un antígeno viral, tal como un antígeno del virus la gripe, tiene un impacto significativo en la difusión del antígeno durante el ensayo SRID. El anillo de difusión resultante es de un tipo inusual. De hecho, cuando se compara con muestras sin adyuvante, las muestras que comprenden un adyuvante, cuando se procesan en un ensayo SRID, daban como resultado un anillo de difusión cuyo aspecto era mucho más oscuro y más difuso, haciendo que la delimitación fuese más borrosa. Se dieron cuenta de que un aspecto tan diferente de los anillos tenía un impacto en los resultados de cuantificación de antígenos obtenidos con el ensayo SRID. Observaron que, en presencia del adyuvante, los resultados mostraban una gran variabilidad y una concentración de antígeno más baja, en comparación con los resultados obtenidos con composiciones similares que no tenían adyuvante. Por lo tanto, el uso del ensayo SRID clásico utilizado en la técnica para evaluar el contenido de HA de las muestras con adyuvante que comprenden un antígeno del virus de la gripe conduce a una medición errónea de ese contenido, ya que este queda subestimado. Tanto la variabilidad del ensayo como la subestimación de la concentración de antígeno, que puede conducir a formulaciones de vacuna con una cantidad de antígeno mal calculado, tienen consecuencias dramáticas, por ejemplo, en la consistencia y eficacia de las vacunas. Tales inconvenientes son inaceptables en el campo de la producción de vacunas.

El procedimiento de acuerdo con la presente invención proporciona una solución para superar estos inconvenientes y proporciona un procedimiento robusto, preciso y fiable para la identificación de un antígeno y/o la determinación de la cantidad de antígeno, tal como un antígeno del virus de la gripe, en preparaciones de virus incluidas vacunas. Este procedimiento presenta la ventaja de ser adecuado tanto para preparaciones de virus con adyuvante como sin adyuvante. Por consiguiente, con el procedimiento de acuerdo con la invención, es posible analizar preparaciones de virus paralelas tanto con adyuvante como sin adyuvante de virus, sin que se requiera, por lo tanto, emplear dos procedimientos distintos. También es un procedimiento simple y fácil de implementar.

El procedimiento de la presente invención se utiliza para identificar un antígeno de interés y/o determinar la concentración de un antígeno de interés, en particular, un antígeno del virus de la gripe, tales como, por ejemplo, el antígeno hemaglutinina (HA).

El ensayo SRID clásico fue originalmente diseñado por Wood y col. (An improved single radial immunodiffusion technique for the assay of influenza haemagglutinin antigen: adaptation for potency determination of inactivated whole virus and subunit vaccines. J. Biol. Stand. 5 (1977) 237-247; International collaborative study of single radial diffusion and immunoelectrophoresis techniques for the assay of haemagglutinin antigen of influenza virus. J. Biol. Stand. 9 (1981) 317-330). Este ensayo se utiliza ahora de forma rutinaria como un procedimiento estándar para medir la concentración de un antígeno del virus de la gripe, tal como HA, dentro de una composición, tal como una vacuna. Muchas empresas de fabricación de vacunas usan el ensayo SRID para medir el contenido de HA de sus vacunas contra la gripe. Este ensayo clásico, generalmente, implica el tratamiento de muestras de ensayo que comprenden HA con una baja concentración de detergente, normalmente de 1 % (p/v), antes de cargarlas en pocillos pre-formados sobre gel impregnado con anticuerpos anti-HA específicos y dejar que se produzca la difusión

del antígeno en el gel (por ejemplo, ver los documentos WO 2009/000433, US 20090092620 y EP2014279). Detergentes típicos son detergentes zwitteriónicos, tales como Zwittergent. Aunque el documento WO 2009/081172 desvela dosis más altas de detergente, de hasta el 8 % (p/v), se ha utilizado esta dosis más alta y se ha demostrado que sólo funciona en combinación con sales añadidas de forma exógena, en particular, sales fosfato.

5 El procedimiento de acuerdo con la invención, que también se llama SRID modificado en el resto de la memoria descriptiva, utiliza una concentración de detergente al menos 10 veces mayor que la concentración del 1 % (p/v) utilizada en la técnica. La concentración de detergente es al menos 10 % (p/v). El procedimiento de la presente invención se ha demostrado que funciona con la concentración de detergente, incluso en ausencia de sales añadidas exógenamente. Los detergentes adecuados para el procedimiento de la divulgación son similares a los
10 detergentes empleados generalmente para el ensayo SRID clásico. Estos pueden ser iónicos, tales como sarcosilsulfato sódico, o no iónicos, tales como Triton X-100™, Nonidet P-40™ o Tween 80™. Detergentes no iónicos incluyen detergentes zwitteriónicos. Detergentes zwitteriónicos, incluyendo betaínas, tales como Empigen™ y sulfo-betaínas, tales como Zwittergents, se utilizan en el ensayo SRID modificado de la invención. Los detergentes zwitteriónicos anteriores se utilizan cuando el antígeno de interés cuya concentración debe determinarse es un
15 antígeno del virus de la gripe, tal como HA. En un aspecto de la divulgación, el detergente utilizado es un Zwittergent, en particular, Zwittergent 3-14™ (n-Tetradecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato) o Zwittergent 3-12™ (N-Dodecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato). En un aspecto alternativo de la divulgación, el detergente es Empigen™. En una realización, la concentración de detergente utilizada para el tratamiento de las muestras de ensayo y/o muestras de referencia en el procedimiento de la invención, es de al menos 10 % (p/v).

20 En el sentido de la presente invención, "tratar una muestra con un detergente" significa que un detergente se añade a la muestra. El detergente se puede dejar en incubación. Adecuadamente, el tiempo de incubación es de al menos 1 minuto, adecuadamente al menos 5 minutos, adecuadamente al menos 10 min, adecuadamente al menos 20 min, y adecuadamente al menos 30 min. Generalmente, la incubación se produce con agitación, de forma adecuada, a temperatura ambiente.

25 Aparte del porcentaje de detergente, el ensayo SRID modificado se puede llevar a cabo en las mismas condiciones que las condiciones utilizadas cuando se procede a un ensayo SRID clásico. En particular, cuando se utiliza para medir la concentración del antígeno dentro de una muestra con adyuvante, el procedimiento de la invención no requiere una etapa previa de desorción del antígeno del adyuvante.

30 Por ejemplo, los geles utilizados en el ensayo SRID modificado como se desvela en la presente memoria son los mismos que los utilizados para el ensayo SRID clásico. Estos están adecuadamente hechos de agar o agarosa, aunque se puede utilizar cualquier otro material adecuado siempre que soporten la difusión radial de los antígenos y la precipitación de los complejos antígeno/anticuerpo. Por lo general, contienen pocillos circulares pre-definidos en los que se cargan las muestras. El contenido de los pocillos se difunde a continuación radialmente en el gel. Un gel utilizado en el ensayo SRID, ya sea clásico o modificado, generalmente incluirá múltiples pocillos para albergar las
35 muestras y permitir el análisis paralelo. Por consiguiente, se pueden analizar en un único ensayo múltiples muestras del mismo material, independientemente de si son muestras de ensayo o muestras de referencia, por lo general a diferentes diluciones de la muestra.

Los geles contienen anticuerpo específico para el antígeno de interés a una concentración que permite la formación de inmunocomplejos a una distancia adecuada del centro de difusión para una concentración de antígeno diana. El
40 anticuerpo está presente a una concentración sustancialmente uniforme, que puede o no puede ser conocida. La preparación de tales geles se conoce en la técnica. El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. Convenientemente, los anticuerpos específicos para el antígeno de interés utilizados para impregnar el gel son policlonales.

45 De acuerdo con el procedimiento de la invención, el gel contiene un anticuerpo anti-HA utilizado para medir la concentración de una muestra que comprende un antígeno HA del virus de la gripe.

Tanto en el ensayo SRID modificado como en el clásico, el resultado del ensayo es la formación de una zona de reacción en el gel entre los antígenos que se difunden desde los pocillos en los que se cargaron y los anticuerpos específicos comprendidos en el gel. Cuando los pocillos son circulares, la zona de reacción tiene forma de anillo. El anillo tiene un diámetro interno y un diámetro externo. El diámetro externo, o la superficie delimitada por la
50 demarcación externa del anillo, es proporcional a la concentración del antígeno presente dentro del pocillo. La cuantificación del antígeno de interés puede, por lo tanto, obtenerse comparando la dimensión (diámetro y/o superficie) de los anillos obtenidos después de cargar un pocillo con una concentración conocida de un antígeno de referencia. Los diámetros se pueden medir en dos direcciones en ángulo recto entre sí. Alternativamente, la cuantificación se puede obtener mediante la comparación de las medidas de superficie respectivas de los anillos. La
55 medición puede ser operada manualmente, es decir mediante inspección visual utilizando reglas o rejillas colocadas directamente sobre los anillos. Alternativamente, se pueden tomar las imágenes de las placas que muestran los anillos de difusión o se puede tomar una imagen en vivo con una cámara conectada a un ordenador. A continuación, puede utilizarse una regla sobre la pantalla para medir los anillos, ya sea a partir de una imagen o de la imagen en vivo. Alternativamente, la medición puede ser operada semiautomáticamente, es decir, un software integrado puede
60 proporcionar una herramienta informática que permite seleccionar o delimitar la superficie de los anillos, ya sea en

fotos o en una imagen en vivo. Como un ejemplo no limitante de un dispositivo adecuado que permite una medición de este tipo, se puede citar el dispositivo KS400 de Carl Zeiss. El software es capaz de medir entonces la superficie, ya sea directamente, por ejemplo mediante la medición de los números de píxeles comprendidos en la zona de anillo seleccionado, o a través de la medida del diámetro en dos direcciones en ángulo recto. Como alternativa, la medición puede ser operada automáticamente. Un ejemplo de una medición automática se describe en el documento WO 2005/033965. En un aspecto de la divulgación, las dimensiones del anillo de difusión se miden de forma semiautomática.

En el contexto de la presente invención, por una "muestra de ensayo" se entiende cualquier preparación o cualquier composición, tal como una vacuna, que comprende un antígeno de interés, cuya concentración debe ser determinada. Dicha muestra de ensayo puede incluir opcionalmente un adyuvante, en particular, una emulsión de aceite en agua. En una realización, la muestra de ensayo comprende un antígeno del virus de la gripe, tal como HA, opcionalmente en combinación con un adyuvante, tal como, por ejemplo, una emulsión de aceite en agua.

En el sentido de la presente invención, una "muestra de referencia", es una muestra que comprende un antígeno que sirve de referencia, llamado un antígeno de referencia, en la que se conoce la concentración del antígeno. Adecuadamente, este antígeno es del mismo tipo que el antígeno de interés. Las muestras de referencia que comprenden antígeno de referencia de concentración conocida se utilizan para la calibración, lo que permite, en particular, trazar una curva estándar. Adecuadamente, las muestras de referencia y las muestras de ensayo se preparan y se tratan de una manera similar al procesamiento seguido en el ensayo SRID modificado de la presente invención. En particular, cuando las muestras de ensayo comprenden un adyuvante, a las muestras de referencia se les añade generalmente un adyuvante similar, adecuadamente en la misma proporción, antes de proceder al ensayo. En un aspecto de la divulgación, a las muestras de referencia se les añade el mismo adyuvante que el presente en las muestras de ensayo (dado el caso), adecuadamente una emulsión de aceite en agua.

La dimensión (diámetro y/o de superficie) del anillo de precipitación determinada después de la difusión de la muestra de ensayo se compara con la dimensión (diámetro y/o superficie) del anillo determinada después de la difusión de la muestra de referencia. Generalmente, se preparan y se cargan en un gel diferentes diluciones de las muestras de referencia con el fin de obtener diferentes dimensiones del anillo (diámetro o superficie) correspondientes a las concentraciones de las diferentes diluciones, lo que permite trazar la curva estándar. Mediante la comparación de los valores de la dimensión del anillo obtenidos para las muestras de ensayo con los valores obtenidos para las muestras de referencia, se puede calcular la concentración del antígeno de interés presente en la muestra de ensayo. Por ejemplo, la concentración se puede calcular de acuerdo con los procedimientos de ensayo de relación entre pendientes estándar (Finney, D.J. (1952). *Statistical Methods in Biological Assay*. London: Griffin, Citado en: Wood, JM, y col (1977). *J. Biol. Standard*. 5, 237-247). Por consiguiente, en una realización, el procedimiento de la presente invención comprende la etapa adicional de (e) determinar una dimensión de los anillos de precipitación formados en un gel por las muestras de ensayo tratadas previamente con un detergente, como se describió anteriormente y aplicadas a un gel que comprende anticuerpos apropiados. En una realización adicional, el procedimiento de la presente invención comprende la etapa adicional de (f) determinar una dimensión de los anillos de precipitación formados en un gel por las muestras de referencia tratadas previamente con un detergente, como se describió anteriormente y aplicadas a un gel que comprende anticuerpos apropiados. En una realización adicional más, el procedimiento de la presente invención comprende la etapa adicional de (g) comparar la dimensión determinada en la etapa (e) con la dimensión determinada en la etapa (f) y utilizando los resultados de la comparación, calcular la concentración de antígeno en las muestras de ensayo.

Los antígenos de referencia pueden ser cualquier antígeno, que sea similar al antígeno de interés y cuya concentración sea conocida, concentración que se ha determinado de acuerdo con cualquier ensayo de proteínas que sea fiable, reproducible y libre de interferencias por las sustancias químicas que puedan estar presentes en las muestras. Como un ejemplo ilustrativo no limitante, si se mide la concentración de antígeno en una formulación de vacuna, que comprende opcionalmente un adyuvante, el antígeno de referencia puede ser el antígeno a granel que se obtuvo al final del procedimiento de producción, antes de la etapa de formulación, por ejemplo antes de ser formulado con un adyuvante. Si el antígeno es un antígeno del virus de la gripe, tal como HA, la concentración de antígeno en la preparación a granel se mide adecuadamente mediante el ensayo SRID clásico. Este tipo de antígenos de referencia es particularmente adecuado cuando se utiliza el procedimiento de la presente invención para controlar la estabilidad de la vacuna, tales como las vacunas con adyuvante, tal como se describe a continuación. Como alternativa, los antígenos de referencia pueden ser antígenos purificados proporcionados por institutos con certificación de la OMS (Organización Mundial de la Salud), como el NIBSC (Instituto Nacional de Estándares y Controles Biológicos), cuya concentración es conocida.

La determinación de la concentración de antígeno, y por lo tanto, el contenido, dentro de una muestra de ensayo por el procedimiento de acuerdo con la invención es adecuada para el cálculo de la cantidad exacta que debe ser incluida en una formulación de vacuna final. Como alternativa, la determinación de la concentración de antígeno o el contenido de acuerdo con el procedimiento de la invención, se utiliza adecuadamente para examinar la vida útil (es decir, la estabilidad) de una vacuna, independientemente de si tiene adyuvante o no, después de haber sido producida y formulada. Por lo tanto, el procedimiento de la invención para la cuantificación de la concentración o contenido de antígeno dentro de una composición, opcionalmente, con adyuvante puede tener una amplia aplicación, en particular, en los campos de ensayo de la calidad y control de calidad.

De acuerdo con una realización, el procedimiento de la invención se utiliza para supervisar la estabilidad de un antígeno dentro de una muestra de ensayo, tal como una vacuna, que comprende un antígeno del virus de la gripe, que comprende opcionalmente además un adyuvante, tal como una emulsión de aceite en agua. Por ejemplo, el procedimiento de la invención se puede usar para cuantificar la concentración o contenido de antígeno, tal como HA, en de una muestra de ensayo, en particular, en una vacuna, después de que dicha muestra, o vacuna, ha estado almacenada durante un cierto periodo de tiempo después de su formulación, como 7 días, 14 días, 30 días, un mes o unos meses, tales como 6, 9, 12 o 18 meses, a diferentes temperaturas, tales como 4 °C, temperatura ambiente, 30 °C o 37 °C. En una realización, el procedimiento de la invención se usa para cuantificar el contenido de HA en una vacuna contra el virus de la gripe, opcionalmente formulada con un adyuvante que comprende una emulsión de aceite en agua, vacuna que ha estado almacenada durante un periodo de tiempo seleccionado del grupo que consiste en: 7 días, 14 días, 30 días, 1 mes, 6 meses y 18 meses a la temperatura seleccionada de entre el grupo que consiste en: 4 °C, temperatura ambiente, 30 °C y 37 °C.

Las "muestras de ensayo" convenientemente procesadas mediante el procedimiento de la presente invención pueden contener cualquiera de una variedad de antígenos, en particular, antígenos bacterianos o antígenos virales. Antígenos bacterianos adecuados son, por ejemplo, antígenos de *H. influenzae*, o antígenos del tétanos. A modo de ejemplos que ilustran los antígenos virales, se pueden citar, el virus de la polio, el virus de la rabia o el virus de la gripe.

Una "muestra de ensayo", que se analiza de acuerdo con el procedimiento de la invención es una vacuna contra el virus de la gripe, la cual puede haber sido producida de acuerdo con cualquier procedimiento conocido, tal como producida en huevos o reproducida en cultivo celular. Tipos de células adecuadas de soporte de la replicación y propagación del virus de la gripe son líneas celulares de mamíferos, tales como, pero no limitados a líneas celulares, MDCK, Vero o PER.C6. Alternativamente a las líneas de células de mamíferos, las células de aves se usan adecuadamente para la replicación y propagación del virus de la gripe, incluyendo fibroblastos de embrión de pollo o líneas celulares derivadas de patos, tales como las células EB66[®]. Las vacunas antigripales disponibles en la actualidad generalmente se basan ya sea en virus vivos o en virus inactivados. El procedimiento de la invención se puede utilizar para analizar el contenido de antígeno de cualquier tipo de vacuna antigripal, en particular, de las vacunas antigripales inactivadas, que pueden estar basadas en viriones completos, virus fraccionados o antígenos de superficie purificados, tales como en una vacuna de subunidades. Los procedimientos de inactivación viral se conocen en la técnica. La inactivación se puede producir mediante el uso de al menos uno o más agentes químicos, tales como beta-propiolactona o formaldehído, así como los medios físicos, tales como irradiación UV. Procedimientos de división de virus, tales como virus de la gripe, son bien conocidos en la técnica (WO02/28422). La división del virus se lleva a cabo alterando o fragmentado el virus completo si es infecciosa (de tipo salvaje o atenuada) o no infecciosa (inactivada) con una concentración de un agente de escisión capaz de provocar la alteración. Los agentes de división generalmente incluyen agentes capaces de romper y disolver las membranas lipídicas. Tradicionalmente, el virus de la gripe fraccionado se producía usando un tratamiento con disolvente/detergente, tal como fosfato de tri-n-butilo o dietiléter en combinación con Tween[™] (conocido como división "Tween-éter") y este procedimiento todavía se usa en algunas instalaciones de producción. Otros agentes de división que se utilizan actualmente incluyen detergentes o enzimas proteolíticas o sales biliares, por ejemplo desoxicolato de sodio. Los detergentes que se pueden utilizar como agentes de división incluyen detergentes catiónicos, por ejemplo, bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB), otros detergentes iónicos, por ejemplo, lauril sulfato de sodio (SLS), taurodesoxicolato, o detergentes no iónicos tales como Tween[™] o Triton X-100[™], o cualquier combinación de dos o más detergentes. En un aspecto de la divulgación, el procedimiento de la presente invención usa muestras de ensayo que comprenden virus de la gripe que estaban inactivados y/o divididos, virus que se produjeron en huevos. En un aspecto alternativo de la divulgación, el procedimiento de la presente invención usa muestras de ensayo que comprenden los virus de la gripe que estaban inactivados y/o divididos, virus que se produjeron en cultivo celular, en particular, en células de aves, tales como en las células EB66[®].

Las muestras de ensayo, además de antígeno y/o adyuvantes también pueden incluir otros excipientes farmacéuticos, tales como, pero no limitados a polisorbato 80 (Tween 80[™]), octoxinol 10 (Triton X-100[™]), succinato de hidrógeno alfa-tocoferol, cloruro sódico, hidrógeno fosfato disódico, dihidrógeno fosfato de potasio, cloruro de potasio y/o agua para inyección.

El procedimiento de acuerdo con la invención es adecuado para medir una amplia gama de concentraciones de antígeno. Por consiguiente, el procedimiento es aplicable para analizar muestras que comprenden una amplia gama de contenido de HA, 1-60 µg por dosis o incluso mayores. Por ejemplo, el procedimiento es adecuado para medir la cantidad de HA presente en una vacuna trivalente contra el virus de la gripe, en la que cada cepa está generalmente presente en una cantidad de 15 µg en un volumen que va desde 250 µl hasta 750 µl, es decir a una concentración que varía de 20 µg de HA/ml a 60 µg de HA/ml por cepa. El procedimiento de la invención también es adecuado para la medición del contenido de HA presente en las muestras de ensayo que comprende una baja cantidad de HA, es decir, preparaciones donde la concentración esperada de HA está por debajo de 20 µg/ml por cepa, en particular, por debajo de 15 µg/ml por cepa, más particularmente, por debajo de 10 µg/ml por cepa. Este puede ser el caso de las vacunas pandémicas o de las vacunas pediátricas. Estas dosis bajas de antígeno se pueden combinar con la presencia de un adyuvante, tal como una emulsión de aceite en agua, para ayudar a reforzar la respuesta inmunitaria a una dosis más baja de antígeno o para contribuir a los enfoques de ahorro de antígeno. Por ejemplo, el procedimiento de la invención es aplicable a una vacuna de la gripe monovalente que incluye, por ejemplo, una cepa

pandémica, en la que el contenido de HA es de entre 1-10 µg de HA por dosis, es decir, una concentración que varía desde 2 hasta 20 µg de HA/ml para una dosis clásica de 0,5 ml. Adecuadamente, la concentración de HA por cepa en la vacuna está entre 1-20 µg/ml, más adecuadamente, entre 5 y 10 µg/ml. Adecuadamente, la concentración de HA por cepa en la preparación es de aproximadamente 15 µg/ml, 7,5 µg/ml, 3,8 µg/ml o menos. Por lo tanto, si se desea, las muestras de ensayo, tales como vacunas, pueden diluirse con el fin de reducir la concentración de antígeno, antes de tratar las muestras con un detergente de acuerdo con el procedimiento de la invención y cargar las muestras tratadas en el gel.

En particular, los inventores observaron que si se diluyen las muestras con adyuvante, de modo que se reduzca la concentración esperada a menos de 20 µg de antígeno/ml, los resultados de la concentración de antígeno obtenidos de acuerdo con el procedimiento de la invención se mejoran aún más. Por consiguiente, en un aspecto de la divulgación, el procedimiento de acuerdo con la invención implica una etapa de diluir las muestras de ensayo antes de tratarlas con un detergente. En particular, después de la dilución la concentración es menos de 20 µg de antígeno/ml, más particularmente, varía de 5 a 20 µg/ml, tal como 7,5 µg/ml. La dilución previa se realiza adecuadamente cuando se utiliza el procedimiento de la invención para el seguimiento de la estabilidad de una muestra de ensayo, tal como una vacuna, que comprende opcionalmente un adyuvante, tal como una emulsión de aceite en agua, como se ha descrito anteriormente. Generalmente, cuando se controla la estabilidad de una vacuna, la concentración del antígeno se determina inicialmente al final de la producción a granel del antígeno, es decir, antes de ser formulada, en particular, antes de ser combinada con un adyuvante. Como se describió anteriormente, dicha determinación se puede realizar usando el ensayo SRID clásico. Por consiguiente, la concentración inicial sirve como la concentración esperada en las pruebas de estabilidad posteriores. Las concentraciones posteriores determinadas después de condiciones de almacenamiento específicas de la vacuna se normalizarán frente a la concentración esperada, lo que explica la estabilidad del antígeno en la vacuna. En un aspecto de la divulgación, la invención proporciona un procedimiento para realizar un ensayo de inmunodifusión que comprende al menos las siguientes etapas de:

- (A) preparar una o más muestras de ensayo que comprenden un antígeno del virus de la gripe,
- (B) diluir las muestras de ensayo para obtener una concentración esperada de menos de 20 µg de antígeno/ml, en particular, que varía de 5 a 20 µg/ml, adecuadamente 7,5 µg/ml,
- (C) aplicar las muestras tratadas a un gel que contiene un anticuerpo específico del antígeno del virus de gripe y
- (D) dejar que las muestras se difundan en el gel.

Este procedimiento se utiliza adecuadamente para el seguimiento de la estabilidad de las muestras de ensayo.

Como la producción de una vacuna comprende numerosas etapas, en particular, varias etapas de purificación del antígeno de interés, una "muestra de ensayo" en el sentido de la presente invención también abarca cualquier composición que comprende un antígeno de interés que es un intermedio en el procedimiento de producción de la vacuna, en oposición a la formulación de la vacuna final.

Una vacuna puede formularse de diversas formas. Por ejemplo, esta puede estar en una forma liofilizada o en una formulación líquida lista para usar. El procedimiento de la invención puede ser aplicable para la determinación de la concentración de antígeno de ambos tipos de formulación. Sin embargo, si se liofiliza, esta primero tiene que ser reconstituida en una solución líquida. Por ejemplo, la vacuna a ensayar, que comprende el antígeno de interés, puede estar en una forma liofilizada que se reconstituye, antes de su uso, en una solución de adyuvante, si la vacuna es para ser formulada con adyuvante, o en cualquier solución fisiológicamente compatible, si la vacuna no va ser formulada con adyuvante. Por consiguiente, la muestra de ensayo, en particular, una vacuna, se puede presentar en forma de uno o más viales, tales como dos viales. La presentación en dos viales, por ejemplo, proporciona un vial que comprende el antígeno de interés, ya sea en una forma liofilizada o en una forma líquida, y el segundo vial comprende un adyuvante en forma líquida, por ejemplo, una emulsión aceite en agua. El procedimiento de la invención es aplicable a cualquier tipo de presentación de la vacuna y puede usarse también para medir el contenido de antígeno de una vacuna que ha sido reconstituida.

Las muestras de ensayo, tales como vacunas, ya sean formuladas con adyuvante o no, que necesitan ser analizadas para determinar su concentración y contenido de antígeno por el procedimiento de la invención pueden ser monovalentes o multivalentes. En particular, la muestra de ensayo multivalente es una vacuna trivalente o una vacuna tetravalente. En una realización, la vacuna a ser analizada tiene un adyuvante y comprende antígenos del virus de la gripe de una, tres o cuatro cepas distintas. En una realización específica la vacuna de la gripe es una vacuna trivalente. En una realización distinta, la vacuna es tetravalente. En una realización alternativa, la vacuna de la gripe es una vacuna monovalente que comprende una cepa del virus de la gripe, en particular, de potencial pandémico.

Los virus de la gripe son virus de ARN de sentido negativo, con envoltura, con un genoma segmentado que pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae*. Se clasifican en función de sus proteínas del núcleo en tres tipos distintos: A, B, y C [Cox NJ, Fukuda K. Influenza. Infect. Dis. Clin. North Am. 1998; 12:27-38]. Los virus de la gripe A pueden infectar a una serie de especies de mamíferos y aves, mientras que los tipos B y C están esencialmente restringidos a los seres humanos. Los virus de la gripe A y B son los principales responsables de enfermedades humanas,

siendo el tipo A el más patogénico. Los principales determinantes antigénicos del virus de la gripe A y B son dos glicoproteínas de superficie: la neuraminidasa (NA) y la hemaglutinina (HA), las cuales son capaces de provocar una respuesta inmunitaria en los seres humanos. La HA está implicada en la unión al receptor y la fusión con la membrana. La NA facilita la escisión de la progenie del virus de las células infectadas, evita la agregación viral, y facilita el movimiento a través del epitelio de la mucosa del tracto respiratorio. Las cepas del virus se clasifican de acuerdo con las especies hospedadoras de origen, sitio geográfico, año de aislamiento, número de serie y, para la gripe A, por las propiedades serológicas de los subtipos de HA y NA. Para los virus de la gripe A se han identificado dieciséis subtipos de HA (H1-H16) y nueve subtipos de NA (N1-N9) [Webster RG y col. *Evolution and ecology of influenza A viruses*. Microbiol.Rev. 1992; 56:152-179; Fouchier RA y col. *Characterization of a Novel Influenza A Virus Hemagglutinin Subtype (H16) Obtained from Black-Headed Gulls*. J. Virol. 2005; 79:2814-2822]. Los virus que contienen todos los subtipos de HA y NA se han recuperado de las aves acuáticas, pero sólo tres subtipos de HA (H1, H2 y H3) y dos subtipos de NA (N1 y N2) han establecido linajes estables en la población humana desde 1918. Sólo se conoce un subtipo de HA y uno de NA para el virus de la gripe B.

Los antígenos de la gripe se pueden derivar de las cepas de gripe interpandémicas (anuales o estacionales). Alternativamente, los antígenos de la gripe se pueden derivar de cepas con el potencial de causar un brote pandémico (es decir, cepas de gripe con nueva hemaglutinina comparado con la hemaglutinina de las cepas que circulan actualmente, o cepas de la gripe que son patógenas en los sujetos aviares y tienen el potencial de ser transmitidas horizontalmente en la población humana, o cepas de la gripe que son patógenas para los seres humanos). Dependiendo de la estación en particular y de la naturaleza del antígeno incluido en la vacuna, los antígenos de la gripe se pueden derivar de uno o más de los siguientes subtipos de hemaglutinina: H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 o H16. Adecuadamente, los antígenos de la gripe se seleccionan del grupo de: H1, H2, H3, H5, H7 y H9.

Opcionalmente, las muestras de ensayo y/o muestras de referencia pueden incluir un adyuvante, en particular una emulsión de aceite en agua. Adecuadamente, el procedimiento de la presente invención permite medir la concentración de antígeno en muestras de ensayo, tales como vacunas, que comprenden una emulsión de aceite en agua, que comprenden opcionalmente otros inmunoestimulantes. En particular, la fase oleosa del sistema de emulsión comprende un aceite metabolizable. El significado del término aceite metabolizable es bien conocido en la técnica. Metabolizable se puede definir como "ser capaz de ser transformado por el metabolismo" (Diccionario Ilustrado de Medicina Dorland, W. B. Sanders Company, 25ª edición (1974)). El aceite puede ser cualquier aceite vegetal, aceite de pescado, aceite animal o aceite sintético, que no sea tóxico para el receptor y que sea capaz de ser transformado por el metabolismo. Las nueces, semillas y granos son fuentes comunes de aceites vegetales. Los aceites sintéticos son también parte de esta invención y pueden incluir aceites comercialmente disponibles tales como NEOBEE® y otros. Un aceite metabolizable particularmente adecuado es el escualeno. El escualeno (2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno) es un aceite insaturado que se encuentra en grandes cantidades en el aceite de hígado de tiburón y en cantidades menores en el aceite de oliva, aceite de germen de trigo, aceite de salvado de arroz, y levadura, y es un aceite particularmente adecuado para su uso en la emulsión de aceite en agua. El escualeno es un aceite metabolizable por el hecho de ser un intermediario en la biosíntesis de colesterol (Índice Merck, 10ª Edición, nº de entrada 8619). En un aspecto de la divulgación, el aceite metabolizable está presente en las muestras de ensayo y/o muestras de referencia en una cantidad de 0,5 % a 10 % (v/v) del volumen total de la muestra.

La emulsión de aceite en agua comprende además un agente emulsionante. El agente emulsionante puede ser adecuadamente monooleato de sorbitán polioxietilenado, tales como Tween 80™ o Polysorbate™. Dicho agente emulsionante está presente adecuadamente en muestras de ensayo y muestras de referencia en una cantidad de 0,125 a 4 % (v/v) del volumen total de la muestra.

La emulsión de aceite en agua comprende opcionalmente un tocol. Los tocoles son bien conocidos en la técnica y se describen en el documento EP0382271. Un tocol adecuado es el tocoferol, en particular, alfa-tocoferol o un derivado del mismo tal como succinato de alfa-tocoferol (también conocido como succinato de vitamina E). Dicho tocol está presente adecuadamente en las muestras de ensayo y/o muestras de referencia en una cantidad de 0,25 % a 10 % (v/v) del volumen total de la muestra o vacuna.

La composición adyuvante, en particular, la emulsión de aceite en agua, puede comprender además un agonista de TLR4 (Toll like receptor (TLR) 4). Por "agonista de TLR4" se entiende un componente que es capaz de causar una respuesta de señalización a través de una vía de señalización de TLR4, ya sea como un ligando directa o indirectamente a través de la generación de ligando endógeno o exógeno (Sabroe y col, JI 2003 p1630-5). El TLR 4 puede ser un derivado de lípido A, particularmente monofosforil lípido A o más particularmente monofosforil lípido 3 desacilado A (3 D-MPL).

Adecuadamente, la emulsión de aceite en agua comprende un aceite metabolizable, tal como escualeno, un tocol, tal como alfa-tocoferol y un agente emulsionante, tal como Tween 80™. Por consiguiente, en una realización de la invención, las muestras de ensayo y/o muestras de referencia comprenden escualeno, alfa-tocoferol y Tween 80™, opcionalmente, en combinación con 3D-MPL.

- 5 3D-MPL está disponible bajo la marca comercial MPL® por GlaxoSmithKline Biologicals North America y promueve principalmente respuestas de células T CD4 + con un fenotipo IFN-g (Th1). Puede ser producido de acuerdo con los procedimientos descritos en GB 2 220 211 A. Químicamente es una mezcla de monofosforil lípido 3-desacilado A con 3, 4, 5 o 6 cadenas aciladas. En particular, en las composiciones con adyuvantes de la presente invención se utiliza 3D-MPL de partícula pequeña. El 3D-MPL de partícula pequeña tiene un tamaño de partícula tal que puede ser esterilizado por filtración a través de un filtro de 0,22 µm. Tales preparaciones se describen en la Solicitud de Patente Internacional N° WO 94/21292. Los derivados sintéticos del lípido A son conocidos y se piensa que son agonistas de TLR 4 incluyendo, pero no limitado a:

OM174 (2-desoxi-6-o-[2-desoxi-2-[(R)-3-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-o-fosfono-β-D-glucopiranosil]-2-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]-α-D-glucopiranosildihidrógenofosfato), (WO 95/14026)

- 15 **OM 294** DP (3S, 9R) -3-[(R)-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]decan-1,10-diol, 1,10-bis(dihidrógenofosfato) (WO99 /64301 y WO 00/0462)

OM 197 MP-Ac DP (3S-, 9R) -3-[(R)-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]decan-1,10-diol, 1-dihidrógenofosfato 10- (6-aminohexanoato) (WO 01/46127)

- 20 Otros ligandos de TLR4 que se pueden usar son fosfatos de alquilglucosaminida (AGP), tales como los desvelados en los documentos WO9850399 o US6303347 (también se desvelan los procedimientos para la preparación de AGP), o **OM 197** MP-Ac DP (3S-,9R)-3-[(R)-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]decan-1,10-diol, 1-dihidrógenofosfato 10-(6-aminohexanoato) (WO 01/46127)

- 25 Otros ligandos de TLR4 que se pueden usar son fosfatos de alquilglucosaminida (AGP), tales como los desvelados en los documentos WO9850399 o US6303347 (también se desvelan los procedimientos para la preparación de AGP) o sales farmacéuticamente aceptables de AGP como se desvela en el documento US6764840. Algunos AGP son agonistas de TLR4, y algunos son antagonistas de TLR4. Ambos se cree que son útiles como adyuvantes. Además, otros agonistas de TLR-4 adecuados se desvelan en los documentos US2003/0153532 y US2205/0164988.

- 30 El procedimiento de la invención para medir la concentración del antígeno en una muestra con adyuvante, tal como una vacuna, es aplicable a una amplia gama de concentración de adyuvante dentro de la vacuna. Si se considera una vacuna de la gripe que comprende una emulsión de aceite en agua, adecuadamente dicha emulsión comprende 11 mg de aceite metabolizable (tal como escualeno) o por debajo de, por ejemplo, entre 0,5-11 mg, 0,5-10 mg o 0,5-9 mg, 1-10 mg, 1-11 mg, 2-10 mg, 4-8 mg o 4,5-5,5 mg y 5 mg de agente emulsionante mg (tales como monooleato de sorbitán polioxietilenado) o por debajo de, por ejemplo, entre 0,1-5 mg, 0,2-5 mg, 0,3-5 mg, 0,4-5 mg, 0,5-4 mg, 1-2 mg o 2-3 mg por dosis de la vacuna. El tocol adecuadamente (por ejemplo, alfa-tocoferol) cuando está presente es 12 mg o por debajo de, por ejemplo, entre 0,5-12 mg, 10-11 mg, 1-11 mg, 2-10 mg, 4-9 mg o 5-7 mg por dosis de vacuna. Generalmente, las dosis de vacuna de la gripe varían de 0,25 ml a 1,5 ml, de manera adecuada, aproximadamente 0,5 ml, adecuadamente aproximadamente 0,6 ml, adecuadamente, aproximadamente 0,7 ml, adecuadamente, aproximadamente 0,8 ml, adecuadamente, aproximadamente 0,9 ml o aproximadamente 1 ml.

- 40 La invención se describirá adicionalmente por referencia a los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplo 1: Comparación de la utilización de detergente al 1 % frente a detergente al 10 % en un ensayo SRID para analizar el contenido de HA de una vacuna que no contiene adyuvante o que está formulada con un adyuvante

- 45 Se analizó el lote VFFLU04-14 de la vacuna antigripal para determinar su contenido de HA de acuerdo con el ensayo SRID modificado de la invención, en comparación con el uso del ensayo SRID clásico de la técnica anterior. Se trata de una vacuna antigripal inactivada de un virión fraccionado trivalente que consiste en tres antígenos virales a granel monovalentes (preparados a partir de las respectivas cepas del virus de la gripe A/New Caledonia H1N1, A/Wyoming H3N2 y B/Jiangsu). Después de su producción, la concentración de HA de los tres antígenos monovalentes a granel se midió usando el ensayo SRID clásico empleando Zwittergent 3-14™ al 1 % (Calbiochem).
- 50 Basándose en esta concentración, se incluyeron 15 µg de cada antígeno a granel en la dosis de vacuna de 500 µl. Por lo tanto, la concentración esperada de HA de cualquiera de las tres cepas en la dosis es de 30 µg de HA/ml. Este lote de vacuna se formuló, a continuación en dos formas diferentes. O bien no se incluyó adyuvante (denominada la forma normal) o se añadió como adyuvante una emulsión de aceite en agua que comprende escualeno, alfa-tocoferol, Tween 80™ y 3D-MPL (denominada forma OW). El contenido de HA para dos de las cepas (A/Wyoming H3N2 y B/Jiangsu) de cada formulación (normal y OW) se analizó de acuerdo con el ensayo SRID clásico (Zwittergent 3-14™ al 1 %) y el ensayo SRD modificado de la presente invención (Zwittergent 3-14™ al 10 %). Los antígenos HA de referencia (conocidos como *Ag Ref*) específicos para cada cepa ensayada y de concentraciones conocidas (proporcionados por el NIBSC) se utilizaron como controles que permiten cuantificar el

contenido de HA de cada cepa analizada en ambos tipos de formulaciones de vacunas (normal y OW). Como un control adicional para el experimento, también se utilizaron antígenos a granel monovalentes específicos de cada cepa ensayada (denominadas *preparación monovalente*). Como se indicó anteriormente, al final de su producción y antes de ser formulado como un lote de vacuna, la concentración de HA de cada preparación monovalente siempre se mide mediante el ensayo SRID clásico (Zwittergent 3-14™ al 1 %). Por lo tanto, como un control interno para el presente experimento, se calculó de nuevo la concentración de HA de preparaciones monovalentes específicas para cada cepa ensayada junto con la vacuna formulada VFFLU04-14 utilizando tanto el ensayo SRID clásico como el modificado. Los antígenos de referencia, las vacunas y las preparaciones monovalentes se incubaron en presencia de Zwittergent 3-14™ al 1 % o Zwittergent 3-14™ al 10 % durante 30 min con agitación a temperatura ambiente. A continuación, se diluyeron de acuerdo con el siguiente esquema: 1/1 (sin diluir), 3/4, 1/2, 1/4. Todas las diluciones relativas a la cepa A Wyoming/H3N2 se cargaron en los pocillos en un gel de agarosa impregnado con un antisuero específico para esa cepa (proporcionado por un instituto con certificación de la OMS), mientras que las diluciones relativas a la cepa B Jiangsu se cargaron en los pocillos en un gel de agarosa impregnado con un antisuero específico para esta cepa (también proporcionado por el NIBSC). Los geles se incubaron durante 24 horas a temperatura ambiente (20 a 25 °C) en una cámara húmeda con el fin de permitir que ocurra la inmunodifusión y se formen los anillos de precipitación alrededor de los pocillos. Seguidamente, se empaparon durante la noche con solución de NaCl y se lavaron brevemente en agua destilada. El gel se prensó y se secó. Cuando estuvieron completamente secos, los geles se tiñeron en una solución de azul Coomassie Brilliant durante 10 minutos, eliminando la tinción dos veces en una mezcla de metanol y ácido acético hasta que si hicieron visibles zonas teñidas claramente definidas. Después de secar los geles teñidos, se tomaron fotografías y mediciones de la superficie de los anillos de precipitación utilizando el dispositivo KS400 (Carl Zeiss). La superficie se expresa en unidades arbitrarias. Dichas mediciones, para cada dilución, se presentan en la Tabla 1 (cepa A Wyoming H3N2) y en la Tabla 2 (cepa B Jiangsu). Los valores representan un valor medio, ya que cada dilución se cargó en los duplicados y se realizaron tres mediciones diferentes por dilución.

Tabla 1 – A/Wyoming/H3N2 – Valores de superficie de los anillos de precipitación

MUESTRA	Zwittergent (%)	DILUCIONES DEL ANTÍGENO			
		1/1	3/4	1/2	1/4
Ag Ref A/W/H3N2	1 %	137,2	125,5	109,5	98
	10 %	131,3	123	108,6	101
Vacuna VFFLU04-14	Normal – 1 %	128,5	119,2	109,3	98
	Normal – 10 %	126,5	118,2	107,3	97,6
	OW – 1 %	103,6	100,3	97,8	94,8
	OW – 10 %	119,5	111,7	103,8	98,3
Preparación monovalente A/W/H3N2	1 %	129,3	119,8	108,2	97
	10 %	126,7	117,3	106,7	97,2

Los % de Zwittergent 3-14™ son en p/v

Tabla 2 – B Jiangsu – Valores de superficie de los anillos de precipitación

MUESTRA	Zwittergent (%)	DILUCIONES DEL ANTÍGENO			
		1/1	3/4	1/2	1/4
Ag Ref B/Jiangsu	1 %	128,8	117,1	107	97,1
	10 %	123,2	116,2	104,3	100,7
Vacuna VFFLU04-14	Normal – 1 %	125,8	116,6	107,5	96,8
	Normal – 10 %	123,6	115,75	107,2	97,9
	OW – 1 %	102	98,9	97,6	94,25
	OW – 10 %	119,9	113,7	105,1	96,5
Preparación monovalente B/Jiangsu	1 %	126,7	118	107,3	96,7
	10 %	125,8	117,7	106,7	97,6

Los % de Zwittergent 3-14™ son en p/v

Se utilizaron los valores de superficie para construir las curvas de dosis-respuesta de diluciones del antígeno frente a la superficie. Las concentraciones de las muestras se calcularon a continuación de acuerdo con los procedimientos de ensayo de relación entre pendientes estándar. Statistical Methods in Biological Assay. London: Griffin, citado en:

Wood, JM, y col (1977). J. Biol. Standard. 5, 237-247). Los resultados de la concentración de las cepas A/Wyoming/H3N2 y B/Jiangsu se presentan en la Tabla 3 y la Tabla 4, respectivamente. Los valores de las columnas " μg de HA/ml esperados" son el resultado de la concentración de las preparaciones monovalentes antes de la formulación en la vacuna, medida usando el ensayo SRID clásico (Zwittergent 3-14™ al 1 %). Basado en este valor de concentración, se incluyeron 15 μg de cada preparación monovalente en una dosis de 500 μl , de modo que el valor esperado de la concentración de HA en la vacuna VFFLU04-14 es de 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Los porcentajes de recuperación de HA se comparan con el valor de control del 100 % correspondiente a la concentración de HA esperada.

Tabla 3 – A/Wyoming/H3N2 – Valores de concentración

MUESTRA	Zwittergent (%)	μg de HA/ml	μg de HA/ml esperados	Recuperación de HA (%)
Vacuna VFFLU04-14	Normal – 1 %	29	30	96
	Normal – 10 %	31	30	103
	OW – 1 %	13	30	43
	OW – 10 %	24	30	80
Preparación monovalente A/W/H3N2	1 %	196	237	83
	10 %	203	237	86

Los % de Zwittergent 3-14™ son en p/v

Tabla 4 – B/Jiangsu – Valores de concentración

MUESTRA	Zwittergent (%)	μg de HA/ml	μg de HA/ml esperados	Recuperación de HA (%)
Vacuna VFFLU04-14	Normal – 1 %	33	30	106
	Normal – 10 %	36	30	120
	OW – 1 %	13	30	43
	OW – 10 %	32	30	106
Preparación monovalente B/Jiangsu	1 %	240	247	101
	10 %	268	247	108

Los % de Zwittergent 3-14™ son en p/v

Resultados – Conclusiones

- La Tabla 1 y la Tabla 2, que muestran ambos valores de superficie de los anillos de precipitación, indican que el uso de Zwittergent al 10 %, en comparación con Zwittergent al 1 %, no tiene ningún impacto en el tamaño de los anillos formados por la muestra sin adyuvante. En efecto, si se consideran las filas *Ag Ref*, los valores de las superficies son similares, independientemente de la concentración de Zwittergent que se utilizaba. Se llega a la misma conclusión si se consideran las filas de vacuna *Normal* o las filas *Preparación monovalente*. No se observan diferencias en los valores de superficie cuando se utiliza Zwittergent al 10 %, en comparación con el uso de Zwittergent al 1 %. Esta observación se aplica a ambas cepas ensayadas, es decir, A/Wyoming H3N2 (ver Tabla 1) y B/Jiangsu (ver Tabla 2).
- Si se consideran las filas *Vacuna* de la Tabla 1 y la Tabla 2 y se compara la formulación *Normal* con la formulación OW usando Zwittergent al 1 %, los valores de superficie obtenidos indican que la presencia del adyuvante tiene un impacto negativo sobre el tamaño del anillo de precipitación. De hecho, los valores en las formulaciones OW son más bajos que los valores de las formulaciones *Normal* (ver diluciones 1/1 y 3/4 de la Tabla 1 y la Tabla 2, donde los tamaños de anillo son del 15 al 20 % más pequeños cuando la formulación contiene un adyuvante). El fenómeno de la reducción del tamaño del anillo, cuando la formulación de la vacuna contiene adyuvante, es cada vez menos visible cuando las muestras se diluyen más (ver diluciones 1/2 y 1/4 de la Tabla 1 y la Tabla 2). En este experimento, las diluciones 1/1, 3/4, 1/2 y 1/4 y del lote de vacuna VFFLU04-14 representan concentraciones teóricas de 30, 22,5, 15 y 7,5 μg de HA/ml, respectivamente. Por lo tanto, los resultados presentados aquí sugieren que la dilución de muestras con adyuvante antes de su análisis mediante el ensayo SRID puede ser ventajosa, ya que a una concentración menor el impacto negativo del adyuvante sobre el tamaño del anillo de precipitación se atenúa.
- Si consideramos de nuevo las filas *Vacuna* de la Tabla 1 y la Tabla 2, y si se compara la formulación OW usando Zwittergent al 1 %, con la formulación OW usando Zwittergent al 10 %, los valores de superficie son más altos cuando se utiliza Zwittergent al 10 % y permiten alcanzar valores similares a los obtenidos para la formulación *Normal*, es decir, sin adyuvante (ver diluciones 1/1 y 1/2 de la Tabla 1 y Tabla 2). Estos resultados

indican que el uso de 10 veces más de Zwittergent cuando a una formulación se le añade adyuvante, permite superar el defecto del tamaño del anillo que se observa cuando se utiliza solamente Zwittergent al 1 %.

- La Tabla 3 y la Tabla 4, que presentan ambas las concentraciones de HA cuantificadas, como resultado de los valores de superficie medidos en la Tabla 1 y la Tabla 2, indican que cuando el adyuvante está presente en la formulación (formulación OW), y si se usa Zwittergent al 1 %, la concentración de HA es significativamente menor, en comparación con la concentración obtenida cuando la formulación es sin adyuvante (formulación *Normal*). Esta observación es aplicable a ambas cepas, A/Wyoming/H3N2 (Tabla 3) y B/Jiangsu (Tabla 4), donde la concentración de HA es, respectivamente, 2,2 y 2,5 veces menor en la formulación OW, en comparación con la formulación *Normal*, usando Zwittergent al 1 %.
- Cuando se utiliza Zwittergent al 10 %, la concentración de HA en la formulación OW se incrementa por un factor de aproximadamente 2 veces, en comparación con la concentración en la formulación OW cuando se utiliza Zwittergent al 1 %, logrando, por lo tanto, una concentración que es similar a la concentración obtenida en formulaciones sin adyuvantes (formulación *Normal*). Esta observación está claramente confirmada e ilustrada por los valores de recuperación de HA.
- La Tabla 3 y la Tabla 4 también confirman que el uso de Zwittergent al 10 % no tiene un impacto negativo en los resultados de concentración, en comparación con el uso de Zwittergent al 1 %. De hecho, tanto el 1 % como el 10 % dan concentraciones similares para las formulaciones *Normal* o *Preparaciones monovalentes*.

Ejemplo 2: Uso de detergente al 10 % en un ensayo SRID para analizar el contenido de HA de una vacuna formulada con un adyuvante

Se analizó el lote EFLAA004A de vacuna antigripal para determinar su contenido de HA de acuerdo con el ensayo SRID modificado de la invención. Se trata de una vacuna antigripal tetravalente que incluye la cepa A/Brisbane/H1N1. Después de su producción, se midió la concentración de HA del antígeno a granel monovalente A/Brisbane/H1N1 o preparación monovalente, usando el ensayo SRID clásico empleando Zwittergent 3-14™ al 1 % (Calbiochem). Esta preparación monovalente fue incluida en la vacuna en la concentración de 30 µg/ml, lo que representa en este experimento la concentración esperada. Este lote de vacuna se formuló a continuación con un adyuvante de emulsión de aceite en agua que comprende escualeno, alfa-tocoferol, y Tween 80™. El contenido de HA de la cepa A/Brisbane/H1N1 se analizó de acuerdo con el ensayo SRD modificado de la presente invención (Zwittergent 3-14™ al 10 %). Se utilizó un antígeno de referencia HA (denominado *Ag Ref*) específico de esta cepa y de concentración conocida (proporcionado por el NIBSC) como un control que permite cuantificar el contenido de HA de esta cepa. Como un control adicional para el experimento, también se usó un antígeno a granel monovalente de esta cepa obtenido antes de la formulación (denominada *Preparación monovalente*). Al final de la producción y antes de ser formulado como un lote de vacuna, se ha medido la concentración de HA de cada preparación monovalente mediante el ensayo SRID clásico (Zwittergent 3-14™ al 1 %). Por lo tanto, como un control interno para el presente experimento, se calculó de nuevo la concentración de HA de esta preparación monovalente junto con la vacuna EFLAA004A con adyuvante utilizando el ensayo SRID modificado. El antígeno de referencia y la preparación monovalente se mezclaron, en primer lugar, con la misma proporción de la misma composición adyuvante que las utilizadas en la vacuna EFLAA004A formulada. El antígeno de referencia con adyuvante, la vacuna con adyuvante y la preparación monovalente con adyuvante se incubaron a continuación en presencia de Zwittergent 3-14™ al 10 % durante 30 min con agitación. Estos se diluyeron a continuación de acuerdo con el siguiente esquema: 1/1 (sin diluir), 3/4, 1/2, 1/4. Todas las diluciones se cargaron en los pocillos en un gel de agarosa impregnado con un antisuero específico de la cepa A/Brisbane/H1N1 (proporcionada por un instituto con certificación de la OMS). El resto del ensayo se realizó como se describe en el Ejemplo 1.

Los valores de superficie se presentan en la Tabla 5 y los valores de concentración en la Tabla 6.

Tabla 5 – A/Brisbane H1N1 – Valores de superficie de los anillos de precipitación

		DILUCIONES DEL ANTÍGENO			
MUESTRA	Zwittergent (%)	1/1	3/4	1/2	1/4
Antígeno de Ref.	10 %	149,6	135,6	122,6	111,4
Vacuna EFLAA004	10 %	148,8	137,2	123,9	103,2
Preparación monovalente A/H1N1	10 %	141,9	131,2	116,7	99,0

Los % de Zwittergent 3-14™ son en p/v

Tabla 6 – A/Brisbane H1N1 – Valores de concentración

MUESTRA	Zwittergent (%)	µg de HA/ml	µg de HA/ml esperados	Recuperación de HA (%)
Vacuna EFLAA004	10 %	30,3	30	101
Preparación monovalente A/H1N1	10 %	689,2	790	87

Los % de Zwittergent 3-14™ son en p/v

Resultados – Conclusiones

- La Tabla 6 indica que la concentración de HA determinada utilizando el ensayo SRID modificado, es decir, Zwittergent al 10 %, en un lote de vacuna con adyuvante emulsión de aceite en agua da resultados similares a los de la concentración esperada. La concentración esperada corresponde a la concentración medida antes de que se formulase la preparación monovalente con el adyuvante. Por lo tanto, como no se observa ninguna diferencia entre los dos valores, esto indica que el uso de Zwittergent al 10 % no da como resultado una subestimación de la concentración de HA dentro de una vacuna con adyuvante, en comparación con la misma vacuna sin adyuvante.

Conclusión general

Estos resultados sugieren que el ensayo SRID modificado de la presente invención, empleando Zwittergent al 10 %, proporciona un procedimiento mejorado para medir la concentración de HA en vacunas con adyuvante que es fiable y preciso. Además, como se concluyó en el Ejemplo 1, este ensayo SRID modificado no tiene ningún impacto sobre la medición realizada en las vacunas sin adyuvante, haciendo que este procedimiento sea adecuado para ambos tipos de formulaciones de vacunas, es decir, con adyuvante y sin adyuvante.

Ejemplo 3: Ensayo del intervalo de dosis de diferentes detergentes para analizar el contenido de HA de una vacuna formulada con un adyuvante mediante un ensayo SRID

Se analizó el contenido de HA del lote DFLUA038AA de vacuna antigripal mediante el ensayo SRID. Se trata de una vacuna antigripal monovalente que incluye la cepa A/California/H1N1. Después de la producción, se midió la concentración de HA del antígeno a granel monovalente o preparación monovalente, usando el ensayo SRID clásico empleando Zwittergent 3-14™ al 1 %. Para el ensayo, se utilizó un antígeno de referencia HA de una concentración conocida específico de esta cepa como el control para trazar la curva estándar (proporcionado por el NIBSC, X179). La preparación monovalente fue incluida en la vacuna a la concentración de 15 µg/ml, lo que representa la concentración esperada en estos experimentos. A continuación, este lote de vacuna se formuló con un adyuvante de emulsión de aceite en agua que comprende escualeno, alfa-tocoferol y Tween 80™. El contenido de HA se analizó mediante el ensayo SRID, analizando (a) un intervalo de dosis de Zwittergent 3-14™ al 1 % (v/p), 5 % (v/p), 10 % (v/p), 15 % (v/p) y 20 % (v/p), así como (b) detergentes distintos, tales como Empigen, Zwittergent 3-12™ y Triton X-100™. Un antígeno de referencia HA (denominado *Ag Ref*) de una concentración conocida y específico de la cepa A/California/H1N1 (proporcionado por el NIBSC, X181) se utilizó como el control para trazar la curva estándar. El antígeno de referencia se añadió con el mismo adyuvante que el utilizado en la vacuna DFLUA038AA formulada y en la misma proporción. (i) En un primer experimento, se añadió el antígeno de referencia con adyuvante con Zwittergent 3-14™ al 10 % (v/p). Se añadieron diferentes muestras de la vacuna con adyuvante, respectivamente, con 1 % (v/p), 5 % (v/p), 10 % (v/p), 15 % (v/p) y 20 % (v/p) de Zwittergent 3-14™. (ii) En un segundo experimento, se añadieron diferentes muestras de antígeno de referencia con adyuvante Triton X-100™ al 1 % (v/p) y Triton X-100™ al 3,6 % (v/p). Se añadieron diferentes muestras de la vacuna con adyuvante, respectivamente, con 1 % (v/p) y 3,6 % (v/p) de Triton X-100™. (iii) En un tercer experimento, se añadieron diferentes muestras de antígeno de referencia con adyuvante, respectivamente, con Empigen™ al 1 % (v/p) y Empigen™ al 10 % (v/p). Se añadieron diferentes muestras de la vacuna con adyuvante, respectivamente, con 1 % (v/p) y 10 % (v/p) de Empigen™. (iv) En un cuarto experimento, se añadieron el antígeno de referencia con adyuvante y la vacuna con adyuvante con Zwittergent 3-12™ al 10 % (v/p). Todas las muestras de antígeno de referencia con adyuvante anteriores y las muestras de vacuna con adyuvante se incubaron con el detergente respectivo durante 30 min con agitación a temperatura ambiente. Todos ellos se diluyeron a continuación de acuerdo con el esquema: 1/1 (sin diluir), 3/4, 1/2, 1/4. Todas las diluciones se cargaron en pocillos en un gel de agarosa impregnado con un anti-suero específico de la cepa A/California/H1N1. El resto del ensayo se realizó como se describe en el Ejemplo 1.

Los valores de superficie de los anillos de precipitación obtenidos en el experimento (i) (intervalo de dosis de Zwittergent 3-14™) se presentan en la Tabla 7. Los valores de concentración calculados en los experimentos (i) (intervalo de dosis de Zwittergent 3-14™), (ii) (Triton X-100), (iii) (Empigen) y (iv) (Zwittergent 3-12™) se presentan en la Tabla 8.

Tabla 7 – A/California H1N1 – Valores de superficie de los anillos de precipitación

MUESTRA	Zwittergent (%)	DILUCIONES DEL ANTÍGENO			
		1/1	3/4	1/2	1/4
Antígeno de Ref A/H1N1	10 %	122,3	116,5	110,0	96,8
Vacuna DFLUA038AA	1 %	100,5	100,8	95,0	95,5
Vacuna DFLUA038AA	5 %	113,8	109,8	105,2	94,2
Vacuna DFLUA038AA	10 %	116,8	109,7	105,5	97,5
Vacuna DFLUA038AA	15 %	117,8	112,0	105,5	97,5
Vacuna DFLUA038AA	20 %	117,2	111,7	106,7	94,0

Los % de Zwittergent 3-14™ son en p/v

Tabla 8 – A/California H1N1 – Valores de concentración

MUESTRA	Detergente (%)	µg de HA/ml	µg de HA/ml esperados	Recuperación de HA (%)	Recuperación de HA (%)
Vacuna DFLUA038AA	Zwitt. 3-14™ 1 %	12,5	15	83	64
Vacuna DFLUA038AA	Zwitt. 3-14™ 5 %	19,5	15	130	100
Vacuna DFLUA038AA	Zwitt. 3-14™ 10 %	19,5	15	130	100
Vacuna DFLUA038AA	Zwitt. 3-14™ 15 %	20,25	15	135	104
Vacuna DFLUA038AA	Zwitt. 3-14™ 20 %	20,25	15	135	104
Vacuna DFLUA038AA	Triton X-100™ 1 %	*	15	*	*
Vacuna DFLUA038AA	Triton X-100™ 3,6 %	*	15	*	*
Vacuna DFLUA038AA	Empigen™ 1 %	*	15	*	*
Vacuna DFLUA038AA	Empigen™ 10 %	15,7	15	104	80
Vacuna DFLUA038AA	Zwitt. 3-12™ 10 %	17	15	113	86

Los % de Zwittergent 3-14™ son en p/v

- 5 * En estas condiciones de detergente, no se obtuvieron anillos de difusión con los antígenos de referencia.
 ** En esta columna, las recuperaciones de HA se han normalizado frente a la recuperación de HA obtenida cuando se usa Zwittergent 3-14™ al 10%

Resultados – Conclusiones

- 10 - La Tabla 8 indica que, entre las condiciones del Zwittergent 3-14™, solamente Zwittergent 3-14™ al 1 % (que es el porcentaje utilizado en la técnica) tuvo como resultado una concentración de HA que es menor que la concentración esperada (recuperación de HA es 83 %), lo que confirma la observación hecha anteriormente en

los Ejemplos 1 y 2 de que Zwittergent 3-14™ al 1 %, cuando se utiliza para la evaluación de una vacuna con adyuvante, no proporciona resultados precisos, ya que da lugar a una concentración de HA subestimada. Por el contrario, cuando el ensayo SRID se realiza con Zwittergent 3-14™ al 5 %, al 10 %, al 15 % o al 20 %, la concentración de HA resultante alcanza la concentración esperada (las recuperaciones de HA son 130 % y 135 %). La observación de que las concentraciones son superiores a la concentración esperada se explica por el hecho de que los antígenos de referencia del ensayo SRID clásico inicial (Zwittergent 4-14™ al 1 %), que permitió incluir la cepa A/California/H1N1 en el lote DFLUA038AA de la vacuna a la concentración de 15 µg de HA/ml (concentración esperada) y los antígenos de referencia del subsiguiente ensayo SRID modificado para analizar las diferentes condiciones del detergente, no eran idénticos. En consecuencia, con el fin de comparar la capacidad de las diferentes condiciones del Zwittergent 3-14™ para proporcionar una medición de la concentración de HA que sea exacta, se normalizaron los valores de recuperación frente al valor de recuperación obtenido cuando se utiliza Zwittergent 3-14™ al 10 %, porcentaje que ha demostrado en los Ejemplos 1 y 2 que proporciona una medición precisa (véase la última columna de la Tabla 8). Los valores normalizados de las recuperaciones de HA indican que Zwittergent 3-14™ al 5 % (100 %), Zwittergent 3-14™ al 15 % (104 %) y Zwittergent 3-14™ al 20 % (104 %) permiten alcanzar concentraciones de HA similares a la concentración de HA lograda cuando se usa Zwittergent 3-14™ al 10 %. Estos resultados sugieren que 5 %, 10 %, 15 % y 20 % representan todos ellos porcentajes de Zwittergent 3-14™ que proporcionan una medición precisa de la concentración de HA en una vacuna antigripal que comprende una emulsión de aceite en agua.

- Con respecto a otros detergentes, los datos presentados en la Tabla 8 (véase la última columna) indican que mientras que 1 % es un porcentaje apropiado para usar, Zwittergent 3-12™ al 10 % y Empigen™ al 10 % también se pueden usar adecuadamente en el procedimiento de acuerdo con la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para realizar un ensayo de inmunodifusión que comprende al menos las siguientes etapas de:
 - (a) preparar una o más muestras de ensayo que comprenden un antígeno del virus de la gripe,
 - (b) tratar las muestras de ensayo con al menos 10 % (p/v) de un detergente zwitteriónico,
 - (c) aplicar las muestras tratadas a un gel que contiene un anticuerpo específico del antígeno del virus de gripe y
 - (d) dejar que las muestras se difundan en el gel.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende la etapa adicional de (e) determinar una dimensión de los anillos de precipitación formados en el gel por las muestras de ensayo tratadas.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que las muestras de referencia que comprenden un antígeno del virus de la gripe de una concentración conocida se preparan y se tratan en las mismas condiciones que las muestras de ensayo y se aplican de manera similar al gel.
4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el antígeno del virus de la gripe es hemaglutinina (HA).
5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, que comprende la etapa adicional (f) de determinar una dimensión de los anillos de precipitación en el gel formados por las muestras de referencia tratadas.
6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende la etapa adicional de (g) comparar la dimensión determinada en la etapa (e) con la dimensión determinada en la etapa (f) y utilizando los resultados de la comparación, calcular la concentración de antígeno en la muestra de ensayo aplicada en la etapa (c).
7. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la muestra de ensayo es una vacuna antigripal inactivada.
8. Un procedimiento para cuantificar la concentración de HA de una vacuna que comprende un antígeno del virus de la gripe que comprende al menos las siguientes etapas de:
 - (i) tratar la vacuna, o una muestra de la misma, con al menos 10 % (p/v) de un detergente zwitteriónico,
 - (ii) tratar las muestras de referencia que comprenden un antígeno del virus de la gripe de una concentración conocida con al menos 10 % (p/v) de un detergente zwitteriónico,
 - (iii) aplicar la vacuna tratada, o una muestra de la misma, y las muestras de referencia tratadas a un gel que contiene un anticuerpo específico del antígeno del virus de la gripe,
 - (iv) permitir que las muestras se difundan en el gel,
 - (v) determinar una dimensión de los anillos de precipitación en el gel formados por la vacuna, o una muestra de la misma, y una dimensión de los anillos de precipitación formados por las muestras de referencia, y
 - (vi) comparar entre sí las dimensiones determinadas en la etapa (v) y usar los resultados de la comparación para calcular la concentración de HA en la vacuna, o en una muestra de la misma, aplicada en la etapa (iii).
9. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la etapa de detergente (b), o las etapas de detergente (i) y (ii) se implementan en ausencia de cualquier sal añadida exógenamente.
10. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que las muestras de ensayo, o la vacuna, y las muestras de referencia comprenden un adyuvante.
11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el adyuvante comprende al menos una emulsión de aceite en agua.
12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la emulsión de aceite en agua comprende escualeno, alfa-tocoferol y Tween 80™.
13. El uso del procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12, para el control de la estabilidad de una muestra de ensayo, o de una vacuna.
14. El uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el contenido de antígeno del virus de la gripe dentro de la muestra de ensayo, o el contenido de HA en la vacuna, se cuantifica después de que la muestra de ensayo, o la vacuna, se ha almacenado durante un periodo de tiempo seleccionado del grupo que consiste en: 7 días, 14 días, 30 días, 1 mes, 6 meses, 12 meses y 18 meses a la temperatura seleccionada del grupo que consiste en: 4 °C, temperatura ambiente, 30 °C y 37 °C.