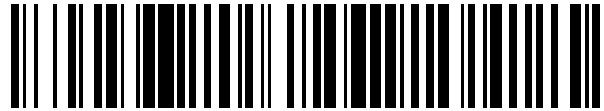


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 138**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2012 E 12818607 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.12.2015 EP 2791680**

54 Título: **Ensayo para Hemaglutinina del virus de la influenza**

30 Prioridad:

12.12.2011 US 201161569597 P

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

18.03.2016

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**DORMITZER, PHILIP;
ANDREWS, WILLIAM;
RINELLA, PAOLA;
ROSA, DOMENICO y
PALLADINO, GIUSEPPE**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 564 138 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).

Ensayo para Hemaglutinina del virus de la influenza

Descripción

5 ÁREA TÉCNICA

Este invento pertenece al área de ensayos para Hemaglutinina del virus de la influenza, por ejemplo, para el análisis de vacunas.

10 ANTECEDENTES DE LA INDUSTRIA

El ensayo estándar para el contenido de hemaglutinina (HA) en las vacunas de influenza inactiva se basa en una sola inmunodifusión radial (“SRID”) [1,2], lo cual fue recomendado por el WHO en 1978 para reemplazar a las pruebas que se basaban en la aglutinación de eritrocitos.

15 Aunque el ensayo SRID es bien establecido, es lento para realizarse, tiene un rango dinámico limitado, una variabilidad considerable, y puede tomar mucho tiempo para preparar y calibrar el suero requerido anti-HA específico. Además, no puede ser utilizado para monitorear el proceso. Por lo tanto, se ha buscado ensayos que no sean SRID para cuantificar a la HA de la influenza.

20 Por ejemplo, la referencia 3 presenta un ensayo que usa una ultrafiltración realizada mediante un RP-HPLC. La referencia 4 presenta un método donde la HA reducida en la presencia de un detergente acilado para proteger sus grupos sulfhidrilos, aplicados a una columna RP-HPLC, y luego eluidos con un agente de emparejamiento iónico en una fase móvil orgánica. La referencia 5 utiliza una separación electroforética de muestras desglicosiladas en conjunto con densitometrías. Los ensayos ELISA también han sido reportados, por ejemplo, en la referencia 6.

25 Algunas alternativas a SRID involucran la modificación de muestras (por ejemplo, desglicosilación, desnaturalización, o derivatización de sulfhidrilos). A algunas alternativas también les falta la discriminación de cepas, por lo que no son útiles para el análisis de productos que contienen múltiples hemaglutininas diferentes (por ejemplo, vacunas estacionales, que usualmente contienen a HA de 3 cepas virales). Además, los métodos que se basan en algunas técnicas fisicoquímicas pueden requerir un personal altamente capacitado.

30 Todavía existe una necesidad para más alternativas mejoradas a los ensayos SRID para cuantificar la HA del virus de la influenza.

35 PRESENTACIÓN DEL INVENTO

40 El invento cuantifica a la HA usando un método que comprende 2 pasos clave: la HA es capturada utilizando lectina, tal como la lectina en campanillas de invierno; y la HA capturada es cuantificado utilizando un inmunoensayo. Este ensayo puede realizarse convenientemente en un formato ELISA. El método es específico, es robusto cuando se enfrenta a otros componentes en la muestra, y es más rápido y más sensible que los ensayos SRID actuales. Convenientemente, sin embargo, puede utilizar los reactivos (por ejemplo, anticuerpos anti-HA) que son preparados actualmente por las autoridades de salud pública para su utilización en los ensayos SRID, y pueden ser utilizados para cuantificar diferentes proteínas HA en una sola muestra capturada utilizando diferentes anticuerpos anti-HA del inmunoensayo.

45 Por lo tanto el invento suministra un método para analizar una vacuna que se conforma de los siguientes pasos: (a) detectar la hemaglutinina del virus de la influenza en la vacuna, o en una de sus muestras, lo que comprende los siguientes pasos: (i) contactar a la muestra con una lectina la cual es inmovilizada en un soporte sólido, para suministrar a la hemaglutinina capturada; y (ii) detectar a la hemaglutinina capturada por medio de un inmunoensayo; y (b) utilizar los resultados del paso (a) para calcular la concentración de hemaglutinina en la vacuna. El paso de detección es idealmente un paso cuantitativo, permitiendo por lo tanto que el monto de HA en la muestra original sea cuantificado.

50 El invento también suministra un método para generar una vacuna a granel con una concentración deseada de hemagglutinina conformado por los siguientes pasos: (a) analizar la hemagglutinina en la vacuna, o en su muestra, por medio de un método del invento; (b) usar los resultados del paso (a) para calcular la concentración de hemagglutinina en la vacuna, o en una de sus muestras, por medio de un método del invento; y (c) usar los resultados del paso (b) para diluir la vacuna a granel para dar la concentración deseada de hemagglutinina.

60 El invento suministra un método para generar una vacuna para el uso del paciente, conformado de los siguientes pasos: preparar una vacuna granel con una concentración deseada de hemaglutinina por medio de un método del invento; y luego extraer una o más dosis en unidades de vacuna del lote diluido.

El invento también suministra un método para generar una vacuna adyuvante a granel que se conforma de los siguientes pasos: preparar la vacuna granel con un contenido deseado de hemaglutinina por medio de un método del invento; y luego mezclar la vacuna diluida a granel con un adyuvante.

5 El invento también suministra un método para generar una vacuna adyuvante para el uso del paciente, que comprende de los siguientes pasos: generar una vacuna adyuvante a granel por medio de un método del invento; y luego extraer una o más unidades de dosis de la vacuna del granel.

10 El paso de captura que se basa en lectina es útil para la purificación de la HA aun sin ninguna detección o cuantificación. Por lo tanto, el invento también suministra un método para purificar la hemaglutinina del virus de la influenza en una muestra, que se conforma de un paso en el cual se contacta a la muestra con una lectina que es inmovilizada en un soporte sólido, donde la lectina es una lectina que se enlaza a la manosa, siempre y cuando la lectina no sea una lectina conA. La HA capturada por la lectina puede eludirse entonces para suministrar material de la HA purificada. Por lo tanto, el paso de captura que se basa en lectina puede utilizarse como una técnica de preparación para la HA de influenza por ejemplo, para preparar estándares de HA con alta pureza. Aquellos estándares pueden ser útiles para preparar vacunas de influenza.

15 El invento puede utilizar un soporte o columna de cromatografía de afinidad para lo cual la lectina (por ejemplo lectina de GNA) es inmovilizada, para su uso en la purificación de afinidad de la HA del virus de la influenza. Aquellos materiales ya están disponibles (por ejemplo, la lectina de GNA enlazada con agarosa de Vector Laboratories) pero su uso en la purificación de la HA del virus de la influenza es algo nuevo.

20 Por lo tanto, los métodos del invento preparan una HA purificada que preferiblemente tiene una concentración conocida de HA de tal forma que puede utilizarse como un reactivo estándar, por ejemplo, como parte de la fabricación de la vacuna. Esta HA purificada es particularmente útil cuando se prepara a partir de los virus de influenza que crecen en un cultivo celular, por ejemplo, en células MDCK. Por ejemplo, la HA purificada puede utilizarse como una medida de control o como un reactivo de calibración para otros ensayos, por ejemplo, para SRID. En la práctica, la HA purificada es sustancialmente libre de otras proteínas (por ejemplo, de neuraminidasa del virus de la influenza) de tal forma que la HA es sustancialmente el único componente proteínico en el material.

25 **Captura de HA por medio de lectina**

30 Los métodos del invento utilizan una lectina inmovilizada para capturar la HA del virus de la influenza. La lectina se enlaza idealmente a los residuos de manosa, tales como los residuos de manosa enlazados con α -1,3. Las varias lectinas enlazadoras de manosa son conocidas en la industria, y estas son típicamente lectinas de plantas (y, en particular, lectina de monocotiledóneas) tales como aquellas de la campanilla de invierno (*Galanthus nivalis*, lectina de 'GNA'), de Narciso (*Narcissus pseudonarcissis*, lectina de 'NPA'), de ajo (*Allium sativum*, lectina de 'ASA'), y de lenteja (*Lens culinaris*, lectina de 'LCH'). La concanavalina A (de *Canavella ensiformis*, lectina de 'ConA') es una lectina enlazadora de manosa que es usada comúnmente.

35 La lectina para su uso con el invento para cuantificar a la HA es preferiblemente una lectina enlazadora de manosa, pero no una lectina de ConA. La lectina es preferiblemente una lectina que no sea enlazadora de galactosa. Ejemplos de lectinas enlazadoras de galactosa incluyen a la lectina de *Erythrina christagalli* (ECL - *Erythrina christagalli* lectin) de β - galactosa específicamente y la lectina de *Euonymus europaeus* (EEL - *Euonymus europaeus* lectin) de α - galactosa específicamente.

40 La lectina para su uso con el invento para purificar la HA es una lectina enlazadora de manosa, pero no una lectina de conA.

45 Manosa es un residuo de carbohidratos común en las glicoproteínas, por ejemplo, HA y NA. No fue claro si las lectinas enlazadoras de manosa serían capaces de capturar a HA específicamente y eficientemente a partir de otros componentes virales. Sorprendentemente, los inventores encontraron que la lectina enlazadora de manosa (por ejemplo, la lectina de GNA) es capaz de capturar a la HA con una alta especificidad. En particular, la lectina enlazadora de manosa es capaz de capturar a las HAs de diferentes cepas del virus de la influenza, independientemente de sus niveles de glicosilación de HA. Los inventores también encontraron que la lectina enlazadora de manosa es capaz de capturar a la HA de los virus de la influenza que fueron cultivados en varios anfitriones, por ejemplo, células de huevos y de MDCK. Por lo tanto, la variación de la glicosilación que depende de células anfitrionas de glicoproteínas de envoltura viral no parece afectar la especificidad de captura de la lectina enlazadora de manosa para la HA.

50 La lectina para su uso con el invento idealmente tiene una afinidad de enlace más alto con la HA que otras proteínas de envoltura viral (es decir, que no son HA), cápsulas vacías, ácidos nucleicos y/o proteínas de anfitriones (es decir, por el cultivo del virus de la influenza). La lectina preferida para su uso con el invento es GNA, preparado originalmente a partir de bulbos de campanillas de invierno. Esta lectina es naturalmente un homotetrámero y por lo menos 6 variaciones diferentes de secuencias de aminoácidos o isoformas han sido reportadas para la lectina de

GNA (IDENTIFICACIONES SECUENCIALES NÚMEROS: de la 1 a la 6 en este documento). Su estructura en 3 dimensiones se ha determinado. Cada monómero en el tetrámero tiene 3 sub-dominios, cada uno de los cuales se enlaza a una manosa para dar una lectina 12-valente. En contraste con muchas lectinas finas enlazadoras de manosa (a) no es una metaloproteína y su actividad de enlace no requiere cationes ambivalentes (b) no enlaza también a los residuos de glucosa enlazados por α . Tal como se muestra a continuación, la lectina de GNA captura eficientemente a la HA del virus de la influenza para suministrar un material purificado, por ejemplo, para la detección, cuantificación o para su uso como un antígeno estándar, etcétera.

El invento puede utilizar lectina de GNA de tipo silvestre o puede usar formas modificadas que todavía retienen la actividad útil de enlace de HA de la lectina de GNA de tipo silvestre. Por lo tanto, la lectina utilizada con el invento puede comprender cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las identificaciones de secuencia números: 1 a 6, que son variaciones del precursor de lectina de GNA. Como una alternativa, la lectina puede (i) comprender un fragmento de por lo menos n aminoácidos consecutivos de cualquiera de las identificaciones secuenciales números: 1 a 6; y/o (ii) comprender una secuencia de aminoácidos con por lo menos x% de identidad secuencial a cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las identificaciones secuenciales números: 1 a 6, siempre y cuando puedan enlazarse a la HA del virus de la influenza, donde x es 70 o más, por ejemplo, 75, 80, 85, 88, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o más (por ejemplo 100) y n es 7 o más (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o más). Fragmentos adecuados incluyen aquellos que no tienen el péptido de señalización natural de las IDENTIFICACIONES SECUENCIALES NÚMEROS: 1 a 6 (por ejemplo, que no tienen los aminoácidos 1-26 de la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 6). Varias lectinas relacionadas con GNA son conocidas en la industria [8]. Sin embargo, ninguna de las GNA conocidas, o sus variantes o isóformas, y lectina relacionadas con GNA han sido utilizadas como parte de la fabricación de la vacuna de la influenza, por ejemplo, para purificar, detectar o cuantificar la HA.

La lectina será usada típicamente en la forma de un oligómero, por ejemplo, un tetrámero.

Para su uso con el invento, la lectina es inmovilizada en un soporte sólido. Soportes apropiados pueden escogerse dependiendo del formato que se desee de cualquier ensayo, por ejemplo, el soporte puede ser un plato sólido, una esfera, una columna de soporte, etcétera. Un soporte preferido es un plato adecuado para su uso en un ensayo ELISA. Por ejemplo, la lectina puede inmovilizarse en un plato plástico de varios pozos, por ejemplo, un plato de micro titulación de 96 pozos o de 384 pozos. Soportes de poliestireno son típicos para ELISA, aunque soportes de polilactato también pueden ser utilizados.

Otros soportes sólidos, por ejemplo, aquellos usados comúnmente en métodos cromatográficos de afinidad, incluyen camas empacadas, adsorbentes de membranas y monolitos [9]. Para camas empacadas, las matrices contienen típicamente resinas (esferas) y están hechas usualmente de material de resina polimérica u orgánica. Esferas que se basan en polímeros pueden ser hechas de polímeros naturales (por ejemplo, agarosa, compuestos de dextrano de agarosa, celulosa y dextrano) o polímeros sintéticos (por ejemplo, poli(acrilamida), divinilbenzeno de poliestireno, derivados de poli(acrilamida) y poli(metacrilato)). Ejemplos de materiales de resina inorgánica incluyen a hidroxiapatita, sílice y vidrio de poros controlados. Las esferas pueden ser de forma esférica y no esférica y están disponibles como resinas porosas, no porosas y de núcleos sólidos. Los tamaños de los poros de las esferas porosas convencionales varían desde 10 a 100 nm. Los monolitos incluyen aquellos hechos de copolímeros de poli(metacrilato), poli(acrilamida), poliestireno, divinilbenzeno de poliestireno, celulosa modificada y sílice. Los monolitos pueden ser en forma de discos, tubos y de varas con varios tamaños de poros. Adsorbentes de membranas adecuados incluyen a celulosa, poliamina, polisulfona, hidrazida y membranas compuestas (por ejemplo, óxido de polietileno y polietersulfona cubierta con celulosa de hidroxietilo). Los adsorbentes de membranas pueden ser láminas planas, fibras vacías o dispositivos de flujos radiales.

La inmovilización de la lectina puede lograrse en varias formas. Para muchos formatos de ensayos (por ejemplo, ELISA) podría ser suficiente el adsorber la proteína no específicamente a un soporte; para otros formatos la lectina puede ser inmovilizada por medio de un enlazador covalente utilizando química estándar, por ejemplo, tal como se utiliza comúnmente para preparar soportes de cromatografía de afinidad.

Para secciones en las cuales la HA capturada será expuesta a ensayos no necesariamente se eluirá al HA antes de ejecutarse el ensayo (pero para algunos formatos de ensayo que no son ELISA tal elución podría ser deseada o necesaria). Para secciones en las cuales la HA está siendo purificada entonces la HA debe ser eluida después de su captura, y esto puede lograrse al contactar la lectina inmovilizada con un ligando de alta afinidad para la lectina, por ejemplo, con oligosacáridos libres de manosa o que contienen manosa, como es común en una cromatografía de afinidad.

Inmunoensayos de HA

La mayoría de secciones del invento incluyen un paso en el cual la HA capturada es detectado utilizando un inmunoensayo. El inmunoensayo es idealmente un inmuno ensayo cuantitativo, de tal forma que el paso de detección permite que el monto de HA en la muestra se determine.

En un ensayo se utilizará un anticuerpo anti-HA, que puede ser policlonal o monoclonal. Idealmente el anticuerpo es de una cepa específica, tal como un HA específico puede detectarse aun en la presencia de otras es decir de HA. Por ejemplo, en una vacuna de temporada actual (las cepas A/H1N1, A/H3N2, y B) el invento (al igual que SRID) puede permitir la medición de cada una de las 3 rutinas de HA aún en la presencia de las otras al utilizar 3 anticuerpos anti-HA diferentes, cada uno de los cuales es específico para sólo una de las proteínas de HA. Por lo tanto, el invento puede involucrar la captura universal (por medio de una lectina que se enlaza a cada HA) incluyendo una detección específica (por medio de un inmunoensayo que puede distinguir entre las diferentes proteínas de HA que están presentes en la muestra). En algunas secciones, sin embargo, específicamente aquellas para analizar materiales de HA monovalentes (por ejemplo vacunas a granel monovalentes) el invento puede realizarse fácilmente utilizando un anticuerpo anti-HA (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) que es ampliamente reactivo con HA de diferentes tipos de múltiples HA o con HAs de múltiples cepas con el mismo tipo de HA.

Anticuerpos anti-HA adecuados están ampliamente disponibles. Por ejemplo, las agencias de salud pública preparan antisueros para su uso en el análisis de vacunas en cada temporada de influenza. Estos antisueros pueden ser utilizados con el invento, pero otros anticuerpos anti-HA también pueden ser utilizados. El anticuerpo puede modificarse para permitir la adherencia de una enzima para propósitos de ELISA (refiérase más adelante).

El anticuerpo anti-HA es idealmente un anticuerpo IgG. El IgG de oveja es particularmente útil con el invento. El IgG de oveja adecuado puede purificarse a partir de sueros referenciales suministrados como reactivos de SRID por las autoridades de salud pública.

El inmunoensayo es realizado idealmente in situ, es decir con un HA que todavía está enlazada a la lectina. En otra sección, la HA es el ruido de la lectina y el inmuno ensayo es realizado después de su elución, es decir, la HA ya no está enlazada a la lectina.

Formato ELISA

Una sección importante del invento es un formato ELISA, y más preferiblemente un formato de emparejado ELISA. Este formato es utilizado puesto que los reactivos, los equipos y los técnicos lo conocen muy bien y sus protocolos estándar (por ejemplo, la inmovilización, la captura, el enjuague, la detección, la calibración, etcétera) pueden ser utilizados fácilmente para suministrar resultados cuantitativos confiables.

En el formato ELISA la lectina inmovilizada captura a la HA, y la HA capturada se expone entonces a anticuerpos anti-HA. El formato del ensayo puede involucrar un anticuerpo primario (que se enlaza a la HA) en un anticuerpo secundario (que se enlaza al anticuerpo primario), con el anticuerpo secundario conformado de una enzima. Este arreglo primario/secundario significa que el mismo anticuerpo secundario enlazado con la enzima puede utilizarse varias veces, sin necesitar preparar un nuevo anticuerpo de detección conjugado con enzimas para cada nuevo HA. En un formato preferido, sin embargo, ELISA utiliza un anticuerpo anti-HA marcado, el cual es contactado entonces con una enzima que se enlaza a la marcación. Por ejemplo, un anticuerpo anti-HA conjugado con biotina puede enlazarse para capturar a HA y entonces se agrega una enzima conjugada con estreptavidina. La enzima que ahora está movilizada en el soporte sólido es utilizar entonces para catalizar una reacción que puede ser fácilmente puesta en un ensayo, tal como en la técnica ELISA estándar.

El invento puede utilizar una enzima que sea adecuada para su uso en ELISA, por ejemplo cualquier enzima que puede convertir un sustrato en un producto detectable, tal como un producto tinturado, luminiscente (por ejemplo, fluorescente) o electro químicamente activo. Enzimas como estas incluyen, pero no se limitan a fosfatasa alcalina (que puede convertir a pNPP a un producto soluble tinturado) o una peroxidasa tal como una peroxidasa de rábano picante (que puede convertir a la bencidina de tetrametilo para producir un producto soluble tinturado; otros sustratos típicos incluyen a ABTS, OPD).

El invento utiliza pasos conocidos y estándar de los protocolos existentes de ELISA, por ejemplo, la calibración, el enjuague, los controles negativos, los controles positivos, la replicación, etcétera. La técnica Elisa es realizada idealmente en un plato de 96 o de 384 pozos.

En algunas secciones, el invento puede utilizar al protocolo alterno Elisa presentado en la referencia 10. En este protocolo, el anticuerpo anti-HA y la HA son mezclados antes de contactar a la HA con la lectina. En otras secciones, sin embargo, el protocolo ELISA estándar es utilizado, en el cual la HA es capturada por la lectina y entonces el anticuerpo anti-HA es agregado. Si el protocolo alterno es utilizado, entonces el método debería utilizar un anticuerpo anti-HA que no bloquee al lugar de enlace de la lectina en la HA, y que sea simple de examinar para detectar anticuerpos monoclonales que cumplan este requerimiento.

Los inventores encontraron que Elisa puede ser sensible a anticuerpos anti-anfitrión (por ejemplo, huevos), por ejemplo, que pueden ser encontrados en los sueros referenciales NIBSC y CBER, y esto podría conllevar a una calibración inexacta y/o una cuantificación inexacta de una muestra. Los inventores encontraron que esta inexactitud puede minimizarse si el virus para el cual los anticuerpos anti-HA han sido generados y la HA (en los estándares o muestras de calibración) son derivadas de fuentes diferentes. Por ejemplo, un anti-HA generado en contra de los

virus de la influenza que fue cultivado en huevos (es decir, virus de la influenza derivados de huevos) pueden utilizarse para detectar a la HA del virus de influenza que han crecido en cultivos celulares (es decir, HA derivada de cultivos celulares). En contraste, los anticuerpos anti-HA generados en contra de los virus de la influenza que crecieron en cultivos celulares (es decir, virus de influenza derivados de cultivos celulares) pueden ser utilizados para detectar HA de los virus de influenza que fueron cultivados en huevos (es decir, HA derivados de huevos).

Por lo tanto, el invento suministra un método para cuantificar a la HA en una muestra comprendida de HA derivada de cultivos celulares utilizando el formato Elisa del invento, donde Elisa es calibrada utilizando HA derivada de cultivos celulares y anticuerpos anti-HA generados en contra de virus de influenza derivados de huevos. Antisueros anti-HA útiles incluyen aquellos suministrados por NIBSC o CBER.

En contraste, el invento suministra un método para cuantificar la HA en una muestra conformada de HA derivada de huevos utilizando el formato Elisa del invento, donde ELISA es calibrada utilizando HA derivada de huevos y anticuerpos anti-HA generados en contra del virus de influenza derivados de cultivos celulares.

El estándar de calibración de antígenos para ELISA comúnmente tiene una concentración conocida de HA, por ejemplo, tal como se determinó por ELISA, SRID u otros ensayos convencionales tales como la absorción a 280 nm y el ensayo BCA.

Purificación de HA

Los métodos del invento utilizan una lectina enlazadora de manosa que no es una lectina de conA en un paso de captura para purificar la HA de la muestra. Por lo tanto, el invento suministra un método para purificar la HA del virus de la influenza en una muestra, conformado de un paso en el que se contacta a una muestra con una lectina que es inmovilizada en un soporte sólido. Por ejemplo, el invento utiliza lectina como el ligando de afinidad en los métodos cromatográficos de afinidad. En una sección, el invento utiliza lectina inmovilizada en un soporte o columna de cromatografía de afinidad para la recuperación y purificación de HA de una muestra.

Idealmente, la proteína HA purificada retiene su inmunogenicidad (es decir, puede provocar la producción de anticuerpos cuando se administra a un sujeto) y actividad (por ejemplo, puede aglutinar eritrocitos). La HA purificada puede utilizarse como un componente de la vacuna.

Alternamente, la HA purificada puede utilizarse como un estándar o control de calibración, es decir, en inmunoensayos (por ejemplo, ELISA o SRID), para la preparación de vacunas para la influenza.

Preferiblemente, los métodos del invento utilizan una lectina de GNA, o una de sus variaciones o isoformas, o una lectina relacionada con GNA, tal como se mencionó anteriormente.

Los métodos del invento pueden utilizar una muestra que comprende a antígenos del virus de la influenza que han sido cultivados en células de huevos o de mamíferos. Preferiblemente, las células de mamíferos no son MDCK o Vero. Los métodos del invento pueden utilizar una muestra comprendida de antígenos de por lo menos una cepa del virus de la influenza. Preferiblemente, la muestra comprende más de una cepa del virus de influenza.

Los métodos del invento pueden comprender el tratamiento de una muestra que contiene el virus de la influenza antes de purificar la HA, por ejemplo, desactivando y/o dividiendo al virus de la influenza. Por lo tanto, un método para purificar la HA puede utilizar una muestra que contiene virus desactivados, incluyendo viriones completos, viriones divididos, antígenos o virosomas superficiales purificados. Preferiblemente, la muestra no contiene viriones completos. Preferiblemente, la muestra no contiene viriones completos de las cepas A/Puerto Rico/8/34, A/Wisconsin/67/2005 y B/Malaysia/2506/2004.

Alternamente, los métodos del invento pueden utilizar una muestra que contenga virus vivos de influenza. El invento también suministra una vacuna del virus de la influenza conformado de HA, donde la vacuna es (i) una vacuna preparada a partir de HA a granel, donde la HA en el lote ha sido cuantificada en un método que utiliza un estándar de calibración de HA preparado de acuerdo a los métodos del invento, y/o (ii) parte de un lote de vacunas en el cual por lo menos una vacuna del lote ha sido cuantificada en un método que utiliza un estándar de calibración de HA preparado de acuerdo a los métodos del invento.

La muestra de HA purificada es idealmente sustancialmente libre de otros componentes virales, tal como libre de neuraminidasa (NA), libre de proteínas encubridoras virales, cápsulas vacías y ácidos nucleicos. La HA purificada también es sustancialmente libre de proteínas del anfitrión (por ejemplo, de huevo o celulares), ácidos nucleicos y reactivos del cultivo celular (si los virus fueron cultivados en un cultivo celular). Idealmente, la muestra purificada tiene un mínimo de proteínas del anfitrión (por ejemplo, del huevo o de la célula tal como las células MDCK).

Idealmente, el invento utiliza lectina enlazadora de manosa que no sea le lectina de conA como el ligando de afinidad en métodos cromatográficos de afinidad que son conocidos en la industria por su capacidad de purificar proteínas, por ejemplo, columnas spin o FPLC [por ejemplo, las referencias 11, 12]. Los pasos de purificación por

medio de cromatografía incluyen comúnmente la incubación de una muestra con el ligando de afinidad para capturar al analito, y eluir al analito capturado. También se incluyen pasos opcionales de enjuague.

5 Por ejemplo, los métodos de purificación del invento podrían incluir el equilibrar un soporte sólido en el cual está inmovilizada la lectina (por ejemplo, un soporte o columna de cromatografía de afinidad), la adsorción de lectina en el soporte, la incubación de una muestra con la lectina inmovilizada para capturar a la HA, y la elución de la HA capturada como proteínas de HA purificadas. Opcionalmente, la muestra puede mezclarse con octilglucósido (es decir, n-Octil-beta-D-glucopiranosida) antes de la incubación con la lectina inmovilizada. Por ejemplo, el octilglucósido está presente en una concentración final de 1.5 por ciento (masa/volumen).

10 Soportes sólidos útiles para el invento son mencionados anteriormente, y también son mencionados en la referencia 13. Soportes adecuados incluyen matices poliméricas, por ejemplo, aquellas que tienen un diámetro de poros promedio de alrededor de 100 nm y una densidad de ligandos de entre 4.0 y 5.0 miligramos/mililitros. La lectina inmovilizada en las matrices poliméricas pueden comprarse de GALAB Technologies GmbH. Los soportes contienen agarosa, por ejemplo, Sepharose 4B reticulada, también es adecuada para el invento, particularmente aquellas con una densidad de ligando de alrededor de 3 mg/mililitros de gel reposado. La lectina movilizada en sefarosa reticulada está disponible comercialmente, por ejemplo, de Vector Laboratories Inc. Actigel ALD (Sterogene Bioseparation Inc.) con un tamaño de esferas de alrededor de 60-160 μm y alrededor de un 4% de agarosa también puede ser adecuado.

20 Soportes sólidos adecuados que contienen partículas de vidrio porosas también pueden ser útiles, por ejemplo, Trisopor® 4000 Diol de VitraBio GmbH, que tiene un tamaño de partículas de alrededor de 125 a 200 μm y un tamaño de poro de alrededor de 350-400 nm. Otros soportes sólidos útiles incluyen aquellos se contienen esferas de celulosa, por ejemplo, Cellufine™ Formyl (Chisso Corporation) que tienen un tamaño de partículas de alrededor de 25 125-210 μm . Membranas reforzadas de celulosa también zona de barras, por ejemplo, los adsorbentes de membranas Sartobind® Epoxy (Sartorius AG) que tienen un tamaño de poro de, un ejemplo, alrededor de 0.45 micrómetros.

30 La inmovilización de la lectina enlazadora de manosa puede lograrse de varias formas. Por ejemplo, la lectina enlazadora de manosa pueden inmovilizarse por medio de un enlazador covalente usando química estándar, por ejemplo, tal como se utiliza comúnmente para preparar soportes de cromatografía de afinidad. Comúnmente, la densidad de la lectina inmovilizada es de alrededor de 3-8 mg/mililitros de adsorción. Una persona con conocimiento en la industria podrá determinar la densidad de lectina inmovilizada apropiada de acuerdo a técnicas conocidas en la industria.

35 La elución de la HA capturada puede lograrse al contactar a la lectina inmovilizada con un ligando de alta afinidad para la lectina, por ejemplo, con oligosacáridos libres de manosa o que contienen manosa, tal como prácticas comunes en la cromatografía de afinidad. La HA capturada puede eluirse utilizando α -metil-manopiranosido.

40 Preferiblemente, por lo menos un 75%, 80%, 90% o un 95% de la HA (masa) es recuperada de la HA total (masa) en el material de inicio utilizando métodos de purificación del invento.

45 La HA en las muestras purificadas puede cuantificarse, por ejemplo, tal como se determina por medio de ELISA del invento u otros ensayos, por ejemplo, ELISAs que utilizan anticuerpos para capturar a HA, SRID, adsorción de 280 nm y el ensayo BCA.

50 La HA purificada puede tratarse por uno o más pasos adicionales, por ejemplo, cromatografía de exclusión de tamaños, cromatografía de intercambio iónico, HPLC, cromatografía utilizando matrices heparinizadas o sulfatadas, etcétera. Los métodos del invento podrían incluir más pruebas que se utiliza comúnmente en la industria para evaluar la inmunogenicidad, la actividad o la toxicidad de la HA purificada.

55 Cuando la HA purificada es utilizada como una vacuna, la vacuna idealmente no contiene lectina. En las secciones donde la muestra de HA purificada contiene lectina, pasos adicionales pueden ser incluidos para remover a la lectina. Las vacunas que contienen menos de 10 ng (por ejemplo, menos de 1 ng o menos de 100 pg) ADN de células anfitrionas por cada 15 μg de hemaglutinina son preferidas, tal como lo son las vacunas que contienen menos de 10 ng (por ejemplo, menos de 1 ng, menos de 100pg) de ADN de células anfitrionas por cada 0.25 mililitros en volumen. Las vacunas que contienen menos de 10 ng (por ejemplo, menos de 1 ng, menos de 100pg) de ADN de células anfitrionas por cada 50 μg de hemaglutinina son más preferidas, tal como lo son vacunas que contienen menos de 10 ng (por ejemplo, menos de 1 ng, menos de 100 pg) de ADN de células anfitrionas por cada 60 0.5 mililitros en volumen.

La muestra

65 La muestra que es analizada o purificada utilizando al invento contiene (o por lo menos se sospecha que contiene) hemaglutinina del virus de la influenza (HA). A menudo se realiza SRID en materiales que contienen HA de varias cepas (por ejemplo material trivalente). El invento puede ser utilizado con muestras multivalentes (por ejemplo, 2-

Valentes, 3-Valentes, 4-Valentes o más) y pueden detectar por separado y/o cuantificar antígenos de cada cepa al usar los reactivos de detección apropiados, que ya son conocidos por su utilización con SRID. En otras secciones, sin embargo, el invento puede ser utilizado para analizar o purificar HA en muestras monovalentes.

5 El invento puede ser utilizado con varios tipos de muestras. Pueden ser utilizados para analizar una vacuna final, pero como el método analítico es destructivo esto usualmente será una sola vacuna del lote, con resultados analíticos que indican las propiedades del lote. La muestra puede haber sido tomada de un material de vacuna a granel, con resultados analíticos que indican propiedades de todo el granel. En otras secciones, la muestra puede incluso contener al virus, por ejemplo, podrían ser fluidos de cultivo que contienen al virus provenientes de un cultivo celular o de huevos. La muestra puede por lo tanto, ser del material inicial, del material de la vacuna final, o cualquier intermedio de fabricación entre el cultivo del virus y la vacuna final. Preferiblemente, la muestra tiene un mínimo de proteínas del anfitrión (es decir, el anfitrión utilizado para cultivar al virus de la influenza).

10 La muestra incluirá comúnmente a HA de viriones de influenza, pero, como una alternativa, podría incluir a HA que fue expresado en un anfitrión recombinante (por ejemplo, en una línea celular de insectos utilizando un vector de baculoviridae) y purificada [14, 15, 16] o puede estar en la forma de partículas similares a virus (VLPs - virus-like particles; por ejemplo, vea las referencias 17 y 18). En general, sin embargo, los antígenos vendrán de viriones y por lo tanto la muestra podría, en adición a HA, incluir otras proteínas del virus de la influenza (por ejemplo, las proteínas PB1, PB2, PA, NP, NA, M1, M2, NS1 y/o NS2), y también puede incluir a lípidos del virus de la influenza.

15 Antígenos del virus de la influenza derivados de viriones se basan tanto en virus vivos como en virus desactivados (por ejemplo refiérase a los capítulos 17 y 18 de la referencia 19). Aunque el invento puede ser utilizado para determinar niveles de HA a partir de virus vivos, las dosis de vacunas vivas se basan en dosis infecciosas medias del cultivo de tejidos en vez de en el contenido de HA, y por lo tanto el invento usualmente será utilizado para determinar los niveles de HA en una vacuna desactivada.

20 Las vacunas desactivadas pueden basarse en viriones completos, viriones 'divididos', antígenos superficiales purificados (incluyendo HA y, usualmente, también incluyendo neuraminidasas) o virosomas (partículas liposomales tipo virus libres de ácidos nucleicos [20]). El invento puede ser utilizado con todas aquellas vacunas. Los productos BEGRIVAC™, FLUARIX™, PREPANDRIX™, FLUZONE™ y FLUSHIELD™ son vacunas divididas. Los productos FLUVIRIN™, AGRIPPAL™, FLUAD™ y INFLUVAC™ son vacunas de antígenos superficiales.

25 Los productos INFLEXAL V™ y INVAVAC™ son vacunas de virosomas. El invento es más útil para medir el contenido de HA en vacunas divididas y de antígenos superficiales. Por lo tanto, cuando el texto se refiere a la captura de HA, esto puede ser una captura de HA libres, o puede ser una captura de HA en combinación con otros componentes del virus de la influenza, por ejemplo, la HA como una parte de un virión de la influenza. Asimismo, cuando el texto se refiere a la detección de HA, esto puede ser la detección de HA libre, o puede ser la detección de HA en combinación con otros componentes del virus de la influenza, por ejemplo, la detección de HA como parte de un virión de la influenza. En métodos de purificación preparativos del invento, sin embargo, la HA es preparada idealmente como una proteína de HA purificada, por ejemplo, la cual es sustancialmente libre de otros componentes virales, tal como libre de neuraminidasas.

30 El invento puede ser utilizado con HA de cualquier tipo de virus de la influenza, incluyendo a ambos virus de influenza A y el virus de la influenza B (sin importar el origen, por ejemplo, gripe humana, equina, aviar, canina, porcina). El invento por lo tanto, es adecuado para analizar o purificar la HA de una variedad de cepas de la influenza. El invento es usado preferiblemente para los virus de influenza humana, particularmente las cepas para su inclusión en las vacunas humanas.

35 Para los virus de influenza A el invento puede ser utilizado con HA proveniente de cualquier subtipo conocido de HA (H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 o H16), y es particularmente útil con las cepas H1, H3 y H5. La cepa puede tener cualquiera de los subtipos NA que incluyen a N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8 o N9. Por ejemplo, el invento puede ser utilizado para analizar material de una cepa H1N1, una cepa H1 N2, una cepa H3 N2, una cepa H5N1, etcétera. El invento puede ser muy útil para analizar vacunas equivalentes, por ejemplo, que contienen HA de cada uno de los virus A/H1, A/H3 y B.

40 Para la influenza de los virus B el invento puede ser utilizado con HA a partir de una cepa similar a B/Victoria/2/87 o una cepa similar a B/Yamagata/16/88. Estos 2 grupos de cepas son distinguidos usualmente antigénicamente, pero diferencias en secuencias de aminoácidos también han sido descritas para distinguir los 2 linajes, por ejemplo, las cepas B/Yamagata/16/88 a menudo (pero no siempre) tienen proteínas de HA con eliminaciones en el residuo de aminoácidos 164, enumerado en relación a la secuencia de HA 'Lee40' [21].

45 HA que es analizada por los métodos del invento puede ser un HA tipo precursor de longitud completa, conocido como HA0. En algunas secciones, sin embargo, la HA es un fragmento de HA0. HA0 se puede fragmentarse por medio de proteasas de serina, tales como tripsina, para generar un fragmento terminal de N (HA1) Y un fragmento terminal de C (HA2), que pueden permanecer unidas por un puente de disulfuro. Por lo tanto, los métodos del invento no podrían purificar a HA0, HA1 o HA2, y podrían involucrar la detección y el análisis de sólo un fragmento

- como esos (por ejemplo, de HA1). Otros fragmentos de HA que podrían purificarse y analizarse incluyen, por ejemplo, al fragmento liberado por el tratamiento de bromelina, o fragmentos obtenidos por medio del tratamiento con bromelina y tripsina. Comúnmente, los métodos purificarán a HA1, y por lo tanto por lo menos el paso RP-HPLC debería realizarse bajo condiciones de reducción (por ejemplo, utilizando DTT) para asegurar que HA1 y HA2 estén separados, y opcionalmente puedan involucrar un paso de digestión antes de la purificación (por ejemplo, utilizando tripsina) para asegurar una división completa de HA1 y de HA2 (pero esta digestión a menudo no es necesaria, y la presencia de cualquier HA de longitud completa puede examinarse fácilmente para determinar si la digestión sería útil).
- 5 La HA en la muestra podría incluir una región hiper - básica alrededor del lugar de división de HA1/HA2, pero en otras secciones esta región no existe.
- 10 HA en la muestra podría tener una preferencia de enlaces para oligosacáridos con un disacárido terminal de Sia(α 2,6)Gal en comparación a oligosacáridos con un disacárido de terminal de Sia(α 2,3)Gal, o viceversa, o podría no mostrar ninguna preferencia. Ensayos para esta preferencia se mencionan en la referencia 22. Los virus de influenza humana se enlazan a oligosacáridos receptores que tienen un disacárido terminal de Sia(α 2,6)Gal (α -2,6 vinculado a ácido siálico a galactosa), pero las células de huevos y de Vero tienen oligosacáridos receptores con un disacárido terminal de Sia(α 2,3)Gal.
- 15 En algunas secciones la HA tiene un patrón de glicosilación diferente a aquellos patrones vistos en virus derivados de los huevos. Por lo tanto, la HA podría incluir glicofomas que no se pueden ver en los huevos de pollo. HA útiles incluyen glicofomas caninas, por ejemplo el virus puede haber sido cultivado en células de MDCK. Otros HA útiles incluyen glicofomas humanas, por ejemplo, el virus puede haber sido cultivado en células PER.C6. Otro HA útil incluye glicofomas de simio, por ejemplo, el virus puede haber sido cultivado en células Vero. Estas líneas celulares son altamente disponibles, por ejemplo, de la colección del American Type Cell Culture (ATCC - Cultivos Americanos de Tipos de Células), de los Coriell Cell Repositories (depósitos celulares Coriell), o de la European Collection of Cell Cultures (ECACC - Colección Europea de Cultivos Celulares). Por ejemplo, los ATCC suministran varios tipos diferentes de células Vero bajo los números de catálogo CCL-81, CCL-81.2, CRL-1586 y CRL-1587, y suministra células de MDCK bajo el número de catálogo CCL-34. PER.C6 está disponible de ECACC bajo el número de depósito 96022940. Una línea celular adecuada de MDCK es la 'MDCK 33016', depositada como DSM ACC 2219 [23].
- 20 Las líneas celulares más preferidas para el cultivo del virus de la influenza son las líneas celulares MDCK [23-26], derivadas del riñón canino de Madin Darby. La línea celular original de MDCK está disponible de ATCC como CCL-34, pero los derivados de esta línea celular también podrían ser utilizados. Por ejemplo, la referencia 23 presenta una línea celular MDCK que fue adaptada para el crecimiento en cultivos de suspensión ('MDCK 33016', depositado como DSM ACC 2219). Asimismo, la referencia 27 presenta una línea celular derivada de MDCK que crece en suspensión en un cultivo libre de sueros ('B-702', depositado como FERM BP-7449). La referencia 28 presenta células no tumorales de MDCK, incluyendo a 'MDCK-S' (ATCC PTA-6500), 'MDCK-F101' (ATCC PTA-6501), 'MDCK-SF102' (ATCC PTA-6502) y 'MDCK-SF103' (PTA-6503). La referencia 29 presenta a líneas celulares de MDCK con una alta susceptibilidad a infección, incluyendo a las células 'MDCK.5F1' (ATCC CRL-12042). Cualquiera de estas líneas celulares de MDCK puede ser utilizada.
- 25 Los inventores encontraron que la lectina enlazadora de manosa puede capturar específicamente a HA de los virus de la influenza que fueron cultivados en varios anfitriones, por ejemplo, células de huevos y de MDCK. Por lo tanto, los métodos del invento son capaces de capturar a HA independientemente de sus perfiles de glicosilación de HA. La HA en la muestra puede ser de un virus de tipo silvestre o de un virus recombinante, particularmente para el virus de la influenza A. un virus recombinante puede haber sido obtenido por medio de técnicas de genética reversa. Por lo tanto una muestra podría incluir HA de una cepa de virus pero de otros antígenos de influenza (por ejemplo, las proteínas PB1, PB2, PA, NP, M1, M2, NS1 y/o NS2) de una cepa diferente, por ejemplo, de A/PR/8/34, de A/AA/6/60, o de A/WSN/33.
- 30 La concentración de HA en la muestra estará usualmente entre 0.1 microgramos/mililitros y 10 mg/mililitros, por ejemplo, entre 1 μ g/mililitro y 1 mg/mililitro, o entre 10 μ g/mililitros y 100 μ g/mililitros. En algunas secciones la concentraciones son de alrededor de 30 μ g/mililitros, alrededor de 15 μ g/mililitros o alrededor de 7.5 microgramos/mililitros. El invento puede ser utilizado para cuantificar la HA en este rango.
- 35 La muestra podría incluir componentes séricos pero es preferiblemente libre de aquellos componentes.
- 40 La muestra podría incluir proteínas de huevos (por ejemplo, ovoalbúmina y ovomucoide) y/o ADN de gallina, pero en algunas secciones es libre de estos componentes, por ejemplo, cuando el virus creció en un cultivo celular.
- 45 La muestra también podría incluir ADN, por ejemplo, ADN de gallina o ADN de mamíferos (por ejemplo, derivado de células de MDCK, de células Vero, de células PER.C6, etcétera). Idealmente, sin embargo, una muestra contiene menos de 600 ng de ADN por miligramo de HA (preferiblemente menos que 60 ng, y más preferiblemente menos que 6 ng).
- 50
- 55
- 60
- 65

La muestra no incluye, preferiblemente, proteínas virales excepto por las proteínas del virus de la influenza.

5 La muestra podría incluir detergentes, por ejemplo, un surfactante de éster de sorbitán de polioxietileno (conocido como 'Tween', por ejemplo, polisorbato 80), un octoxinol (tal como octoxinol-9 (Tritón X-100) o -10, o t-octilfenoxipolietoxietanol), un bromuro de amonio de cetil- trimetilo ('CTAB' – cetyl trimethyl ammonium bromide), o deoxicolato de sodio, particularmente para una muestra de vacuna de antígenos dividida o superficial. El detergente puede estar presente sólo en montos mínimos, por ejemplo, residuos provenientes de la fabricación de un antígeno. Otros componentes de muestra en montos mínimos podrían ser antibióticos (por ejemplo, neomicina, kanamicina, polimixina B).

10 El invento es descrito aquí en relación al HA del virus de la influenza, pero será aparente que los principios del invento pueden aplicarse de igual forma a más virus y antígenos.

15 **Pasos corriente abajo**

Los métodos del invento permiten la medición de la concentración de HA en el material de interés. Este material, particularmente una vacuna a granel, puede diluirse entonces para generar una concentración deseada final de HA. Por lo tanto, un método del invento podría incluir un paso adicional de dilución de una vacuna que se basa en los resultados de la cuantificación de HA, y el invento suministra un método para analizar una vacuna que se conforma de los siguientes pasos: (a) cuantificar la HA en la vacuna, o en una de sus muestras, por medio de un método que se presenta en este documento; y (b) el uso de los resultados del paso (a) para calcular la concentración de HA en la vacuna. El invento también suministra un método para facilitar una vacuna a granel con una concentración deseada de HA, conformado de dichos pasos (a) y (b), y un paso adicional (c) que usa los resultados del paso (b) para diluir la vacuna a granel para generar la concentración deseada de HA. Dosis en unidades de la vacuna a granel diluida pueden extraerse entonces, y por lo tanto el invento suministra un método para generar una vacuna para el uso del paciente, que se conforma de dichos pasos (a) al (c), y un paso adicional (d) en el cual se extrae una o más dosis en unidades de vacuna provenientes del lote diluido, donde cada dosis en unidades tienen un contenido deseado de HA. El material extraído puede ser colocado en un contenedor, por ejemplo, un frasco o una jeringa.

30 El lote diluido puede ser mezclado con otros componentes, tales como un adyuvante, antes de la extracción de las dosis en unidades por lo tanto, el invento suministra un método para generar una vacuna adyuvante a granel que se conforma de dichos pasos (a) al (c), y un paso adicional (d) al mezclar a la vacuna a granel diluida con un adyuvante. El invento también suministra un método para generar una vacuna adyuvante para el uso del paciente, que se conforma de dichos pasos (a) al (d), y un paso adicional (e) al extraer una o más dosis en unidades de la vacuna a partir del lote diluido, dosis en unidades tienen un contenido deseado de HA. El material extraído puede colocarse en un contenedor, por ejemplo, un frasco o una jeringa.

40 Como una alternativa al mezclar una dosis extraída con un adyuvante, la dosis extraída puede en vez de eso ser empacada como un primer componente de un botiquín en combinación con un 2º componente de botiquín, donde el 2º componente de botiquín es un adyuvante de una vacuna. Los 2 componentes de botiquín pueden combinarse en el momento de su uso para generar una vacuna adyuvante. El botiquín permite que el adyuvante y el antígeno se mantengan por separado hasta el momento de su uso (por ejemplo, como el producto PREPANDRIX™). Los componentes son separados físicamente entre sí dentro del botiquín, y esta separación puede lograrse de varias formas. Por ejemplo, los 2 componentes pueden estar en 2 contenedores separados, tal como frascos. Los contenidos de los 2 frascos pueden mezclarse entonces, por ejemplo, al remover los contenidos de un frasco y agregarlos al otro frasco, o al remover por separado los contenidos de ambos frascos y mezclarlos en un 3º contenedor. En una configuración, uno de los componentes del botiquín está en una jeringa y el otro está en un contenedor tal como un frasco. La jeringa puede ser utilizada (por ejemplo, con una aguja) para insertar sus contenidos en el 2º contenedor para mezclarse, y la mezcla puede ser sacada entonces a la jeringa. Los contenidos mezclados de la jeringa pueden administrarse entonces a un paciente, comúnmente por medio de una nueva jeringa esterilizada. El mantener un componente en una jeringa elimina la necesidad de utilizar una jeringa separada para su administración a un paciente. En otra configuración, los 2 componentes del botiquín se mantienen juntos pero en una forma separada en la misma jeringa, un ejemplo, una jeringa con 2 compartimientos [30]. Cuando la jeringa es activada (por ejemplo, durante su administración a un paciente) los contenidos de los 2 compartimientos se mezclan. Esta configuración evita la necesidad de un paso de mezcla separado en el momento de su uso.

50 Ya sea que el antígeno y el adyuvante se mezclen durante la fabricación o en el momento de la entrega a un paciente, el antígeno generalmente será acuoso y por lo tanto el paso de mezcla involucra la mezcla de 2 líquidos. La tasa del volumen de los 2 líquidos para su mezcla puede variar (por ejemplo, entre 5:1 y 1:5) pero generalmente es alrededor de 1:1. Por lo tanto, los 2 componentes de botiquín podrían incluir sustancialmente el mismo volumen de líquido que el otro.

65 El adyuvante puede mejorar las respuestas inmunológicas (humorales y/o celulares) provocadas en un paciente que recibe la composición. Un adyuvante típico para estos propósitos es una emulsión de agua en aceite. Varias emulsiones adecuadas son conocidas, y estas incluyen típicamente a por lo menos un aceite y por lo menos un

surfactante, siendo los aceites y surfactantes biodegradables (que se pueden metabolizar) y biocompatibles. Las gotas de aceite en la emulsión son, en general, menores que 5 µm de diámetro, y ventajosamente la emulsión comprende gotas de aceite con un diámetro de sub-micrones, logrando estos pequeños tamaños con un microfluidizador para suministrar uniones estables. Las gotitas que tienen un tamaño menor que 220 manómetros son preferidas puesto que pueden ser expuestas a esterilizaciones por medio de filtros.

La emulsión puede incluir aceites de una fuente animal (tal como pescado) o vegetal. Fuentes de aceites vegetales incluyen nueces, semillas y granos. El aceite de nuez, el aceite de soya, el aceite de coco y el aceite de olivos. Los aceites que son más encontrados comúnmente son, por ejemplo, el aceite de nuez. El aceite de jojoba puede ser utilizado, por ejemplo, el que se obtiene de los granos de jojoba. Los aceites de semillas incluyen aceites de cártamo, aceites de semillas del algodón, aceite de semillas de girasol, aceite de semillas que se sésamos y similares. En el grupo de los granos, el aceite de maíz es el que más fácil se puede encontrar, pero el aceite de otros granos cereales tales como el trigo, la avena, el centeno, el arroz, el teff y el triticale y similares también pueden ser utilizados. Esteres de ácidos grasos de 6-10 carbonos de glicerol y de 1,2-propanediol, aunque no ocurre naturalmente en aceites de semillas, pueden prepararse por medio de hidrólisis, separación y esterificación de los materiales apropiados empezando a partir de aceites de nueces y de semillas. Grasas y aceite que provienen de leches de mamíferos se pueden metabolizar y pueden, por lo tanto, ser utilizadas en la práctica de este invento. Los procedimientos para la separación, purificación, saponificación y otros medios necesarios para obtener aceites puros de fuentes animales son bien conocidos en la industria. La mayoría de pescados contienen aceites que se pueden metabolizar que pueden ser recuperados fácilmente. Por ejemplo, el aceite del hígado del bacalao, los aceites de hígados de tiburones, y los aceites de ballenas tales como esperma de ballena son un ejemplo de los varios aceites de pescados que pueden ser utilizados en este documento. Varios aceites de cadenas ramificadas son sintetizados bioquímicamente en unidades de isoprenos de 5-carbonos y generalmente son conocidos como terpenoides. Los aceites de hígados de tiburones contienen un terpenoide no saturado ramificado conocido como escualeno, 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno. Otros aceites preferidos son los tocoferoles, incluyendo al DL-α-tocoferol. Emulsiones conformadas de escualeno son particularmente preferidas. Se pueden usar mezclas de aceites.

Los surfactantes pueden ser clasificados por su 'HLB' (balance hidrófilo/lipófilo). Los surfactantes preferidos del invento tienen una HLB de por lo menos 10, preferiblemente por lo menos 15, y más preferiblemente por lo menos 16. Ejemplos de surfactantes adecuados incluyen, pero no se limitan a: los surfactantes de ésteres de sorbitán de polioxietileno (conocidos comúnmente como los Tweens), especialmente el polisorbato 20 y el polisorbato 80; copolímeros de óxido de etileno (EO - ethylene oxide), óxido de propileno (PO - propylene oxide) y/u óxido de butileno (BO - butylene oxide), vendido bajo la marca DOWFAX™, tal como copolímeros de bloqueo lineal EO/PO; octoxinoles, que pueden variar el número de grupos etoxi que se repiten (oxy-1,2-etanodiilo), con octoxinol-9 (Tritón X-100, o t-octilfenoxipolietoxietanol) siendo de particular interés; (octilfenoxi)polietoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfolípidos tales como fosfatidilcolina (lecitina); ésteres grasos de polioxietileno derivados de alcoholes laurilos, cetilos, estearilos y oleilos (conocidos como surfactantes de Brij), tal como el éter de monolaurilo de trietileneglicol (Brij 30); y ésteres de sorbitán (comúnmente conocidos como los SPANs), tal como el trioleato de sorbitán (Span 85) y monolaurato de sorbitán. Surfactantes preferidos que pueden ser incluidos en las emulsiones son Tween 80 (monooleato de sorbitán de polioxietileno; polisorbato 80), Span 85 (trioleato de sorbitán), lecitina y Tritón X-100. La inclusión del polisorbato 80 es preferida.

Se pueden utilizar mezclas de surfactantes, por ejemplo, mezclas de Tween80 / Span 85. Una combinación de un éster de sorbitano monooleato (Tween 80) y un octoxinol tal como t-octilfenoxipolietoxietano (Tritón X-100) también es adecuada. Otra combinación útil comprende a laureth 9 con un éster de sorbitano de polioxietileno y/o un octoxinol.

Montos preferidos de surfactantes (porcentaje de masa) son: ésteres de sorbitano de polioxietileno (tal como Tween 80) 0.01 a 1%, en particular alrededor de 0.1 por ciento; octil-polioxietanoles o polioxietanoles de nonilfenoxi (tales como Tritón X-100, u otros detergentes de las series Tritón) 0.001 a 0.1 por ciento, en particular 0.005 a 0.02 por ciento; ésteres de polioxietileno (tales como laureth 9) 0.1 a 20%, preferiblemente 0.1 a 10% y en particular 0.1 a 1% o alrededor de 0.5 por ciento.

Adyuvantes específicos de emulsiones de agua en aceites útiles con el invento incluyen, pero no se limitan a:

- Una emulsión de sub micrones de escualeno, Tween 80 y Span 85. La composición de la emulsión en lo que se refiere a volumen puede ser de alrededor de 5% de escualeno, alrededor de 0.5 por ciento de polisorbato 80 y alrededor de 0.5 por ciento de Span 85. En términos de peso, estas tasas se vuelven 4.3 por ciento de escualeno, 0.5 por ciento de polisorbato 80 y 0.48 por ciento de Span 85. Este adyuvante es conocido como 'MF59' [31-33], tal como se describe en mayor detalle en el capítulo 10 de la referencia 34 y en el capítulo 12 de la referencia 35. La emulsión MF59 ventajosamente incluye a iones de citrato, por ejemplo, 10 mM un amortiguador de citrato de sodio.
- Una emulsión conformada de escualeno, un tocoferol, y polisorbato 80. La emulsión podría incluir una solución salina amortiguada de fosfato. Estas emulsiones podrían tener desde el 2 al 10% de escualeno, desde el 2 al 10% de tocoferol y desde el 0.3 al 3% de polisorbato 80, y la tasa de pesos de escualeno:

5 tocoferol es preferiblemente menor o igual que 1 (por ejemplo, 0.90) puesto que esto podría suministrar una emulsión más estable. El escualeno y el polisorbato 80 pueden estar presentes en tasas de volumen de alrededor de 5:2 o en una tasa de masa de alrededor de 11:5. Por lo tanto, los 3 componentes (escualeno, tocoferol, polisorbato 80) pueden estar presentes en una tasa de peso de 1068:1186:485 o alrededor de 55:61:25. Una emulsión de esas ('AS03') puede ser hecha al disolver Tween 80 en PBS para dar un 2% de solución, luego mezclar 90 ml de esta solución con una mezcla de (5 g de DL- α -tocoferol y 5 ml de escualeno), y luego microfluidisar la mezcla. La emulsión resultante podría tener gotitas de aceites en sub-micrones, por ejemplo, con un diámetro promedio de entre 100 y 250 nm, preferiblemente alrededor de 180 nm. La emulsión también podría incluir un lípido A de monofosforilo 3-de-O-acilatado (3d-MPL). Otra emulsión útil de este tipo podría conformarse, en dosis humanas, 0.5-10 mg de escualeno, 0.5-11 mg de tocoferol y 0.1-4 mg de polisorbato 80 [36], por ejemplo, en las tasas mencionadas anteriormente.

- 15 • Una emulsión de escualeno, tocoferol y un detergente Tritón (por ejemplo, Tritón X-100). La emulsión también podría incluir un 3d-MPL (refiérase a secciones posteriores de este documento). La emulsión podría contener un amortiguador de fosfato.
- 20 • Una emulsión conformada de un polisorbato (por ejemplo, el polisorbato 80), un detergente Tritón (por ejemplo, Tritón X-100) y un tocoferol (por ejemplo, un succinato de α -tocoferol). La emulsión podría incluir estos 3 componentes a una tasa de masa de alrededor de 75:11:10 (por ejemplo, 750 μ g/mililitros de polisorbato 80.110 μ g/mililitros de Tritón X-100 y 100 μ g/mililitros de succinato de α -tocopherol), y estas concentraciones deberían incluir cualquier contribución de estos componentes que provengan de antígenos. Esta emulsión también podría incluir a escualeno. La emulsión también podría incluir un 3d-MPL (refiérase a secciones posteriores de este documento). La fase acuosa podría contener un amortiguador de fosfato.
- 25 • Una emulsión de escualeno, polisorbato 80 y poloxámero 401 ("Pluronic™ L121"). La emulsión puede ser formulada en una solución salina amortiguada de fosfato, pH 7.4. Esta emulsión es una portadora de entrega útil para dipéptidos de muramilos, y ha sido utilizado con treonil-MDP en el adyuvante "SAF-1" [37] (0.05-1% de Thr-MDP, 5% de escualeno, 5% de Pluronic L121 y 0.2 por ciento de polisorbato 80). Una microfluidización es preferida.
- 30 • Una emulsión conformada de escualeno, un solvente acuoso, un surfactante no iónico hidrofílico de éter de alquilo de polioxietileno (por ejemplo, éter cetosteárico de polioxietileno (12)) y un surfactante no iónico hidrofóbico (por ejemplo, un éster de sorbitano o un éster de manida, tal como un monoéster de sorbitano o 'Span 80'). La emulsión es preferiblemente termo-reversible y/o tiene por lo menos un 90% de gotitas de aceite (en referencia a volumen) con un tamaño menor a 200 nm [39]. La emulsión también podría incluir uno o más de: alditol; un agente crio - protector (por ejemplo, un azúcar, tal como dodecil maltósido y/o sacarosa); y/o un alquilpoliglicosido. Aquellas emulsiones pueden ser liofilizadas.
- 35 • Una emulsión que tiene alrededor de 0.5-50% de un aceite, 0.1-10% de un fosfolípido y 0.05-5% de un surfactante no iónico. Tal como se describió en la referencia 40, los componentes fosfolípidos preferidos son la fosfatidilcolina, la fosfatidiletanolamina, la fosfatidilserina, el fosfatidilinositol, el fosfatidilglicerol, el ácido fosfatídico, la esfingomielina y la cardiolipina. Los tamaños de gotitas en sub-micrones tienen muchas ventajas.
- 40 • Una emulsión de agua en aceite en sub-micrones de un aceite que no puede metabolizarse (tal como un aceite mineral ligero) y por lo menos un surfactante (tal como lectina, Tween 80 o Span 80). Se pueden incluir aditivos, tales como saponina de QuilA, colesterol, una conjugación de saponinas-lipofílicos (tal como GPI-0100, descrito en la referencia 41, producido por medio de la adición de amina alifática a desacil saponina por medio del grupo de carboxilos del ácido glucurónico), fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, esfingomielina y cardiolipina. Tamaños de gotitas en sub-micrones tienen muchas ventajas.
- 45 • Una emulsión conformada de un aceite mineral, un alcohol graso etoxilado lipofílico no iónico, y un surfactante hidrofílico no iónico (por ejemplo, un alcohol graso etoxilado y/o un copolímero de bloque polioxietileno-polioxipropileno) [42].
- 50 • Una emulsión conformada de un aceite mineral, un alcohol graso etoxilado hidrofílico no iónico, un surfactante lipofílico no iónico (por ejemplo, un alcohol graso etoxilado y/o un copolímero de bloque polioxietileno-polioxipropileno) [42].
- 55 • Una emulsión en la cual una saponina (por ejemplo, QuilA o QS21) y un esteroil (por ejemplo, un colesterol) son asociados como micelas helicoidales [43].

65 La importancia de medir el contenido de HA en vacunas, y de diluir las vacunas a granel a un contenido deseado de HA, surge debido a que las vacunas de influenza desactivada son estandarizadas por sus niveles de HA. Las

vacunas actuales contienen comúnmente 30mg/ml de HA por cepa, aunque dosis más bajas también son utilizadas, por ejemplo, para niños, o en situaciones de emergencia. Las dosis racionales tales como 1/2 (por ejemplo, quise microgramos/mililitros de HA, tal como en FOCETRIA™), 1/4 (por ejemplo, 7.5 microgramos/mililitros, tal como en PREPANDRIX™ cuando es administrada) y 1/8 han sido utilizadas [44.45], tal como dosis más altas (por ejemplo, dosis de 3x o 9x [46,47]). Por lo tanto, la dilución puede ser realizada para dar una concentración de HA de entre 0.1 y 200 µg/mililitros por cepa de virus de la influenza, preferiblemente entre 1 y 150 µg/mililitros, por ejemplo, 1-90 µg/mililitros, 1-20 µg/mililitros, 0.1-15 µg/mililitros, 0.1-10 µg/mililitros, 0.1-7.5 microgramos/mililitros, 0.5-5 µg/mililitros, 3.75-15 µg/mililitros, etcétera. Concentraciones particulares de post-dilución incluyen, por ejemplo, alrededor de 90 µg/mililitros, alrededor de 45 µg/mililitros, alrededor de 30 µg/mililitros, alrededor de 15 µg/mililitros, alrededor de 10 µg/mililitros, alrededor de 7.5 microgramos/mililitros, alrededor de 5 µg/mililitros, alrededor de 3.8 microgramos/mililitros, alrededor de 3.75 µg/mililitros, alrededor de una. 9 µg/mililitros, alrededor de 1.5 microgramos/mililitros, etcétera. Concentraciones más bajas (por ejemplo, menores que 30 µg/mililitros) son más útiles cuando un adyuvante está presente en la vacuna. Aunque concentraciones tan altas como 180 µg/mililitros han sido utilizadas en algunos estudios (por ejemplo, la referencia 48), las composiciones del invento usualmente tendrán una concentración que es igual o menor que 30 µg/mililitros.

General

El término “conformado” abarca a “incluyendo” así como “consiste de” por ejemplo, una composición “conformada de” X podría consistir exclusivamente de X o podría incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.

La palabra “sustancialmente” no excluye a “completamente”, por ejemplo, una composición que es “sustancialmente libre” de Y podría ser completamente libre de Y. Cuando sea necesario, la palabra “sustancialmente” podría ser omitida de la definición del invento.

El término “alrededor de” en relación a un valor numérico X es opcional y significa, por ejemplo, $X \pm 10\%$.

La numeración “GI” es utilizada anteriormente. Un número GI, o un “identificador de información genética”, es una serie de dígitos asignados consecutivamente a cada registro secuencial procesado por NCBI cuando las secuencias son agregadas a su base de datos. El número GI no porta ninguna similitud al número de acceso de registro secuencial. Cuando una secuencia es actualizada (por ejemplo, por una corrección, o para agregar más anotaciones o información) entonces recibe un nuevo número GI. Por lo tanto, la secuencia asociada con un número GI nunca se cambia.

A menos que se indique específicamente, un método conformado de un paso para mezclar 2 o más componentes no requiere ningún orden en específico de mezcla. Por lo tanto, los componentes pueden ser mezclados en cualquier orden. Cuando existen 3 componentes, entonces los componentes pueden ser combinados entre sí, y entonces la combinación puede combinarse con el 3^{er} componente, etcétera.

Cuando materiales animales (y en particular bovinos) son utilizados en el cultivo de células, éstos deberán ser obtenidos de fuentes que no tienen encefalopatías espongiformes transmisibles (TSEs - transmissible spongiform encephalopathies), y en particular que sean libres de encefalopatías espongiformes bovinas (BSE – bovine spongiform encephalopathy). En general, es preferible cultivar células en una ausencia total de materiales derivados de animales.

Cuando un sustrato celular es utilizado para procedimientos genéticos de redistribución o en reversa, es preferible una que haya sido aprobada para su uso en la producción de vacunas humanas, por ejemplo, tal como en el capítulo general 5.2.3 de Ph Eur.

Identidades entre las secuencias de polipéptidos se determinan preferiblemente por medio del algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman tal como se implementó en el programa MPSRCH (Oxford Molecular), utilizando una búsqueda de vacíos afines, los parámetros penalidad abierta de vacíos = 12 y penalidad de extensión de vacíos = 1.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS ESQUEMAS

La figura 1 ilustra el invento, con GNA (triángulos) inmovilizado en la superficie del soporte, que se enlaza a HA (estrellas), al cual se agrega el IgG biotinado.

La figura 2 muestra un cromatograma de material purificado por medio de cromatografía de afinidad utilizando GNA inmovilizado con la vacuna de A/Brisbane/59/07. Las fracciones en cuadros en el pico fueron agrupadas y analizadas por medio de SDS-PAGE, tal como se muestra en las filas marcadas en la figura 3.

La figura 3 muestra un análisis de SDS-PAGE de las fracciones obtenidas de la cromatografía de afinidad utilizando GNA inmovilizado con la vacuna de A/Brisbane/59/07 (tal como se indicó en la figura 2). Las 3

flechas de la izquierda: material reducido y hervido; las 3 flechas de la derecha: material no reducido ni hervido.

5 La figura 4 muestra a OD405nm utilizando IgG de anti-B/Florida (línea sin interrupciones) o IgG de anti-Salomon (línea de puntos). El eje X muestra la dilución de antígenos.

10 La figura 5 es similar a la figura 4, pero muestra el análisis utilizando IgG de sueros de ovejas producidos por la inmunización con HA producidos con huevos de (5A) H1N1 de A/Brisbane/59/07 o (5B) H3N2 de A/Uruguay/716/2007. Las muestras fueron antígenos estándar de H1N1 NIBSC (■), antígenos estándar de H3N2 NIBSC (●), lotes monovalentes de H1N1 de virus que crecieron en cultivos celulares (▲).

15 La figura 6 es similar a la figura 5, excepto que el análisis de las diferentes muestras no se muestra. Se muestran análisis utilizando IgG de antisuero de ovejas producido por la inmunización con HA producida con huevos de (6A) H1N1 de A/Brisbane/59/07 o (6B) H3N2 de A/Uruguay/716/2007. Las muestras fueron antígenos estándar de H1N1 CBER (■), antígenos estándar de H3N2 CBER (●), o lotes monovalentes de H3N2 de virus que crecieron en cultivos celulares (▲).

20 La figura 7 es similar a las figuras 4 y 5, pero muestra el análisis para vacunas a granel monovalentes preparadas de cepas virales que tienen una baja glicosilación de HA: (7A) una cepa de H5N1; (7B) una cepa de H1N1.

25 La Figura 8 muestra la concentración de HA de muestras obtenidas por medio de ELISA y SRID usando antisuero de oveja en contra de A/Brisbane/59/07 (H1N1) producida con huevos. Las muestras de antígenos fueron de HA purificada por columnas de GNA y lotes simples de A/Brisbane/59/07 producidas con MDCK provenientes del lote simple. Las barras negras representan la concentración obtenida cuando la referencia estándar de A/Brisbane/59/07 NIBSC producida en base de huevo fue utilizada como un estándar de calibración; la barra con rayas indican la concentración obtenida cuando el H1 de A/Brisbane/59/07 producido con MDCK fue utilizado como estándar de calibración; y las barras blancas representan la concentración obtenida cuando el lote simple de A/Brisbane/59/07 (H1N1) fue utilizado como estándar de calibración.

30

FORMAS PARA EJECUTAR EL INVENTO

Formato ELISA

35 Un ELISA del invento puede prepararse fácilmente. Protocolos estándar para la preparación de un ensayo ELISA pueden ser utilizados, pero el reactivo de captura en el plato ELISA es una lectina tal como una lectina de GNA. 100 µl de una vacuna del virus de influenza es aplicada a cada pozo (en duplicado) y se incuba a 37 °C durante 30 minutos. Cada pozo recibe entonces 100 µl de IgG anti-HA biotinilado, seguido por unos 30 minutos adicionales de incubación. El plato es enjuagado entonces 4 veces, y se agregan 200 µl de fosfatasa alcalina conjugada con estreptavidina. El plato es incubado durante 30 minutos a la temperatura del cuarto en la oscuridad y es enjuagado nuevamente 4 veces. 200 µl de pNPP son agregados y se le permite proceder a la reacción enzimática durante 30 minutos. Cada pozo es analizado entonces para suministrar resultados cuantitativos. El proceso general toma menos de 3 horas, mientras que el ensayo SRID toma por lo menos 24 horas. Además, puede realizarse fácilmente por personal de laboratorio y no requiere ningún tratamiento de la muestra (por ejemplo, no hay requerimientos de concentración, desglicosilación, desnaturalización, etcétera).

50 Los IgG utilizados en el ensayo fueron purificados a partir de los antisueros de oveja suministrados por NIBSC o CBER usando una columna de proteínas G (HiTrap™ Protein G HP, GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. El contenido de IgG en fracciones diluidas fue determinado por medio de la absorción de 280 nm, considerando que una absorción de 1.4 de OD indica una concentración de IgG de 1 mg/mililitro. Las acciones purificadas con un OD mayor a 0.3 fueron almacenadas y dializadas a 4 °C durante la noche, con 4 l de PBS 1x en un Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes, 10K MWCO (Pierce). Durante la diálisis el amortiguador fue cambiado 3 veces. Los IgGs fueron concentrados a 1 mg/mililitro por medio de centrifugación a 3000 revoluciones por minuto utilizando una columna AMICON ULTRA-15 Ultracel-10k, luego se incubó durante una hora a la temperatura del cuarto agitándose con un exceso molar de 10x de NHS-PEG4-Biotina disuelta en PBS a una concentración de 3 mg/mililitros. Después de su incubación los IgGs expuestos a una columna PD-10 equilibrada en PBS-2 mM de EDTA (pH = 7.3). 8 fracciones de 1 ml fueron recaudadas y la concentración de biotina de IgG fue determinada por la adsorción a 280 nm.

60 Los platos de ELISA fueron preparados en un plato de tiras de pozos de 1x8 de EIA/RIA al agregar 200 µl/pozo de lectina de GNA a una concentración de 50 µg/mililitros en Ca²⁺/Mg²⁺ sin PBS. Los platos fueron envueltos en láminas de plástico e incubados durante la noche a +20 °C. Los pozos fueron aspirados entonces y enjuagados 4 veces con 350 µl/pozo de amortiguador de enjuague (PBS Ca²⁺/Mg²⁺ 1x - Tween 20 0.05%, pH 7.4). Luego los platos fueron incubados con 350 µl/pozo de amortiguador de bloqueo (Tris-HCl 10 mM - NaCl 150 mM - sacarosa 3% - BSA 1%, pH 7.68) durante una hora a la temperatura del cuarto. El amortiguador de bloqueo fue aspirado y los platos

65

podieron ser usados inmediatamente para el ensayo o secados durante la noche a la temperatura del cuarto en un liofilizador y luego almacenados a +4 °C en una bolsa sellada climatizada de aluminio con un paquete desecante.

5 P ara realizar el emparejado ELISA 7 diluciones seriales que se realizaron 2 veces donde las muestras fueron hechas en PBS libre de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$. Cada dilución fue cargada por duplicado en pozos cubiertos con GNA (100 μl /pozo) incubadas durante 30 minutos a 37 °C agitándose. Después de la incubación, los IgGs- biotinilados (diluidos a 8 μg /mililitros en diluyente de biotina (50mM de Tris – 150mM de NaCl - 0.05 por ciento de Tween 20 - 20% de suero de oveja, pH 7.5) fueron agregados (100 μl /pozo) al antígeno sin enjuagarse e incubándose durante otros 30 minutos a 37 °C agitándose. Los pozos fueron aspirados entonces y enjuagados 4 veces con T 150 μl /pozo de amortiguador de enjuague (50mM de Tris – 150 mM de NaCl - 0.05 por ciento de Tween 20) con un lavador automático de platos. Los enlaces de IgG fueron detectados entonces al agregar 200 μl /pozo de fosfatasa alcalina conjugada con estreptavidina diluida a 1 microgramos/mililitro en un amortiguador de enjuague, durante 30 minutos a 37 °C agitándose. Al final de este paso, el plato fue aspirado y enjuagado tal como se hizo antes, luego se agregaron 200 μl /pozo de pNPP a los pozos e incubados durante 30 minutos a la temperatura del cuarto. Los platos fueron leídos a 405 nm en un lector de micro platos.

Especificidad ELISA

20 Para confirmar la especificidad de la cepa la ELISA fue llevada acabo usando antígenos capturados de B/Florida/4/2006 preparados a partir del IgG ya sea para aquella cepa o para la cepa no relacionada A/Solomon/3/2006. La figura 4 muestra a OD405nm para el lote de vacunas monovalentes preparadas a partir de células MDCK (lote Optaflu) en contra de la dilución de antígenos. El IgG anti-B/Florida detectó confiablemente al HA de B/Florida (línea sólida) pero el IgG anti-Salomón no lo hizo (línea de puntos).

25 Asimismo, el IgG en contra de A/Brisbane/59/07 (H1N1) o Uruguay/716/2007 (H3N2) fueron probados en contra de los antígenos referenciales relevantes a partir de NIBSC, y en contra de lotes monovalentes de Optaflu para estas cepas. Las figuras 5 y 6 confirman la especificidad de ELISA. Lotes simples producidos a partir de MDCK de H1N1 o H3N2 fueron detectados solamente por medio del IgG específico para cada cepa; los estándares de antígenos CBER o NIBSC producido a partir de huevos generaron señales positivas de ELISA con antisueros específicos de H1N1 o H3N2.

35 La explicación más posible para la reactividad cruzada observada cuando el antisuero de oveja generado en contra del HA producido a base de huevos fue utilizado para detectar muestras de antígenos producidos a base de huevos (pero no cuando fueron utilizados para detectar muestras de antígenos producidas en base de células de MDCK) es la presencia de proteínas derivadas de huevos en las muestras de antígenos producidos a base de huevos y anticuerpos proteínicos anti-huevos en el antisuero de oveja. Esta conclusión es corroborada por medio de western blots (no se muestran) que indican que el anticuerpo reactivo reticulado reconoce las proteínas que no co- migran con HA.

Aplicabilidad amplia de cepas

40 Para confirmar que el método ELISA es adecuado ampliamente para las cepas del virus de la influenza la captura de lectina de GNA fue probada con una vacuna monovalente a granel preparada a partir de cepas que tenían una glicosilación baja, específicamente para A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) y A/California/04/2009 (H1N1). La figura 7 muestra que la captura funciona bien aún con estas cepas. Por lo tanto, la lectina capturada se adapta fácilmente a diferentes cepas, independientemente de sus niveles de glicosilación de HA.

Comparación con SRID

50 Las muestras fueron tomadas durante 3 etapas de producción de una vacuna a granel monovalente para A/Brisbane/59/07 (H1N1). Estas fueron analizadas para detectar el contenido de HA por medio de SRID, por medio de RP-HPLC, o por medio de ELISA del invento. Los ensayos SRID y RP-HPLC fueron calibrados utilizando el estándar NIBSC relevante; ELISA fue calibrada ya sea con hemaglutinina purificada de A/Brisbane/59/07 o con un lote monovalente de A/Brisbane/59/07 calibrado por medio de SRID. La concentración HA en el ensayo ELISA se calculó como la media de por lo menos 3 diluciones diferentes (el coeficiente de variación fue menor o igual al 20%).

Los resultados en cada etapa fueron los siguientes (mg/ml; '-' = ■no detectable):

60

65

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Ftana	SRID	RP-HPLC	ELISA ¹	ELISA ²
1	-	34	19	19
2	-	33	16	16
3	-	32	16	16
4	-	31	18	19
5	-	3	2	2
6	-	2	-	-
7	-	2	4	4
8	-	2	-	-
9	342	313	280	328
10	124	138	97	125
11	180	175	142	176
12	129	127	106	130
13	29	19	36	36

1: La referencia de ELISA fue una proteína purificada; la referencia de ELISA fue un lote simple calibrado por medio de SRID

Por lo tanto ELISA fue capaz de cuantificar a HA aún a niveles demasiado bajos para su detección utilizando a SRID, y los resultados cuantitativos están en línea con aquellos medidos por medio de otras técnicas.

Purificación preparativa de HA

Un soporte de afinidad con lectina inmovilizada de GNA fue obtenida de Vector Laboratories Inc en Burlingame California (catalog #AL-1243), y fue utilizada con una columna de GE Healthcare HR 16/10 (20ml). Las vacunas a granel de influenza monovalente fueron mezcladas con n-Octil-beta-D-glucopiranosida (octilglucósido, OG; concentración final 1.5%) y se incubó en hielo. Este material fue aplicado a una columna enjuagada, y luego se eluyó utilizando α -metil-manopiranosido.

La figura 2 muestra un cromatograma de un material purificado por medio de cromatografía de afinidad utilizando lectina inmovilizada de GNA con la vacuna de A/Brisbane/59/07. Las fracciones en los cuadros fueron agrupadas y dializadas en contra de PBS. El material dializado fue analizado por medio de SDS-PAGE (figura 3). La HA es muy pura y por lo tanto la cromatografía de afinidad de la lectina de GNA puede utilizarse para una purificación preparativa de la HA.

Estándares antígenos para la ELISA de HA

La figura 8 muestra que cuando un estándar de antígenos NIBSC y antisueros (ambos basados en plataformas de huevos) son utilizados para calibrar el formato de ELISA del invento para la detección de HA en un lote simple de vacunas producidas en base a MDCK, el contenido de HA del lote simple es muy subestimado (27 μ g/mililitros, la primera columna de la izquierda) en relación al contenido determinado utilizando los mismos reactivos en SRID (365 μ g/mililitros, la 4ª columna de la derecha). Por lo tanto, parece que las contribuciones relativas de las interacciones anti-HA y anti-anfitrión (huevo) anticuerpo-antígeno para con la señal en ELISA y en SRID son diferentes. Los inventores consideran que, puesto que el anillo de precipitina en los resultados de SRID provenientes de las interacciones de los anticuerpos de principalmente el antígeno más abundante en la muestra (HA), los efectos del anticuerpo de la proteína celular anfitriona y la proteína celular anti-anfitrión podrían ser mucho menos importantes en SRID que en Elisa.

Los inventores tienen la hipótesis que al usar un HA purificado como un estándar de antígenos eliminaría los efectos proteínicos de las células anfitrionas en ELISA, llevando a sus resultados en un lineamiento con aquellos obtenidos por medio de SRID. Para probar esta hipótesis, los inventores utilizaron a HA producida en células de MDCK, purificada en una columna de GNA y cuantificadas por medio de un SRID convencional a 109 μ g/mililitros (figura 8, la primera columna de la derecha) utilizando estándares de antígenos que se basan en huevos y antisueros como el estándar para ELISA. La cantidad de HA purificada determinada por el SRID convencional correspondió bien a la cantidad de HA en esta muestra determinada por los métodos físicos. La absorción de 280 nm indicó 100 μ g/mililitros de HA y un ensayo BCA indicó 83 μ g/mililitros de HA. Usando este estándar de HA purificada llevó al

valor de ELISA para el lote simple producido por medio de MDCK (327 µg/mililitros, la 2ª columna de la izquierda en la figura 8) a una concurrencia razonable con el valor de SRID para el lote simple (365 µg/mililitros).

5 La hipótesis de que los efectos matriciales en ELISA, pero no en SRID, son responsables por las discrepancias entre ELISA y de SRID predicen que un lote sencillo producido por MDCK, cuantificadas por medio de SRID con estándares y antisueros de antígenos que se basan en huevos podrían ser utilizados para calibrar a ELISA para su uso con muestras producidas por MDCK, siempre y cuando el antisuero de oveja utilizado para la detección en ELISA haya sido provocado por una inmunización con HA producida con huevos. Consistentemente con esta hipótesis, la cantidad de HA producida por MDCK por medio de ELISA (100 µg/mililitros, la 3ª columna de la izquierda en la figura 8) calibrada con este estándar de lote simple cuadro con la cantidad de la misma muestra purificada de HA, determinada por medio del estándar SRID (109 µg/mililitros). Por lo tanto, la información sugiere que el lote sencillo derivado de células cuantificado con concentraciones de HA asignadas por el estándar SRID pueden ser utilizadas como estándar para ELISA para cuantificar a los antígenos producidos por MDCK.

15 En conclusión, ELISA es sensible a los anticuerpos anti-anfitrión (por ejemplo, de huevos) en antisueros convencionales utilizados por SRID. Por lo tanto, la información sugiere que lo mejor es utilizar sueros generados en contra de HA producida por huevos para detectar HA producida por células de mamíferos. Los estándares de calibración de antígenos para el formato ELISA del invento deberían ser purificados o por lo menos no deberían ser producidos a partir de la misma plataforma que produjo al antígeno utilizado para inmunizar a las ovejas para evitar aquellos efectos proteínicos de las células anti-anfitrionas.

20 Se debe entender que el invento ha sido descrito en forma de un ejemplo nada más y que las modificaciones podrían ser hechas mientras se mantienen dentro del enfoque del invento.

25 REFERENCIAS

- [1] Williams (1993) *Vet Microbiol* 37:253-262.
- 30 [2] Fitzgerald y Needy (1986) *Dev Biol Stand* 64:73-79.
- [3] WO2010/136896.
- [4] WO2005/090390.
- 35 [5] Li et al. (2010) *Biologicals (Biológicos)* 38:284-9.
- [6] Brady y Griffiths (1982) *J Biol Standardization (Estandarización Biológica)* 10:9-15.
- 40 [8] Li et al. (2009) *Curr Chem Biol* 3:324-33.
- [9] Wolff y Reichl (2011) *Expert Rev. Vaccines (Vacunas, Revisión Experta)* 10:1451-1475.
- [10] WO2007/066231.
- 45 [11] Opitz et al. (2007) *Vaccine (Vacuna)* 939-947
- [12] Optiz et al. (2008) *Journal of Virological Methods (Revista de Métodos Viroológicos)* 154:61-68
- 50 [13] Opitz et al. (2007) *Journal of Biotechnology (Revista de Biotecnología)* 131:309-317
- [14] WO96/37624.
- [15] WO98/46262.
- 55 [16] WO95/18861.
- [17] Bright et al. (2008) *PLoS ONE* 3:e1501.
- 60 [18] Crevar y Ross (2008) *Virology Journal (Revista de Virología)* 5:131.
- [19] *Vaccines. (Vacunas)* (eds. Plotkin & Orenstein). 4ª edición, 2004, ISBN: 0-7216-9688-0.
- [20] Huckriede et al. (2003) *Methods Enzymol (Métodos de Enzimología)* 373:74-91.
- 65 [21] GenBank sequence (Secuencia del Banco Genético) GI:325176.

- [22] WO2008/032219
- [23] WO97/37000.
- 5 [24] Brands et al. (1999) Dev Biol Stand 98:93-100.
- [25] Halperin et al. (2002) Vaccine (Vacuna) 20:1240-7.
- 10 [26] Tree et al. (2001) Vaccine (Vacuna) 19:3444-50.
- [27] EP-A-1260581 (WO01/64846).
- [28] WO2006/071563.
- 15 [29] WO2005/113758.
- [30] WO2008/001221.
- 20 [31] WO90/14837.
- [32] Podda y Del Giudice (2003) Expert Rev Vaccines (Vacunas Revisión Experta) 2:197-203.
- [33] Podda (2001) Vaccine (Vacuna) 19: 2673-2680.
- 25 [34] Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (Diseño de Vacunas: El Método de Subunidades y de Adyuvantes) (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
- [35] Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols (Adyuvantes de Vacunas: Métodos de Preparación y Protocolo de Investigación) (Volume 42 of Methods in Molecular Medicine series - Volumen 42 de Métodos de las Series en Medicina Molecular). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.
- 30 [36] WO2008/043774.
- [37] Allison y Byars (1992) Res Immunol 143:519-25.
- 35 [38] Hariharan et al. (1995) Cancer Res 55:3486-9.
- [39] US-2007/014805.
- 40 [40] WO95/11700.
- [41] Patente de Estados Unidos 6,080,725.
- 45 [42] WO2006/113373.
- [43] WO2005/097181.
- [44] WO01/22992.
- 50 [45] Hehme et al. (2004) Virus Res. 103(1-2):163-71.
- [46] Treanor et al. (1996) J Infect Dis 173:1467-70.
- 55 [47] Keitel et al. (1996) Clin Diagn Lab Immunol 3:507-10.
- [48] Zangwill et al. (2008) J Infect Dis. 197(4):580-3.

LISTA SECUENCIALES

- 60 <110> Novartis AG
- <120> Ensayos para hemaglutininas del virus de la influenza
- <130> P060225WO
- 65 <141> 2012-12-12

ES 2 564 138 T3

<150> US 61/569,597
 <151> 2011-12-12

5 <160> 6

<170> Seqwin 2010, versión 1.0

10 <210> 1
 <211> 157
 <212> PRT
 <213> Galanthus nivalis

15 <400> 1

```

Met Ala Lys Ala Ser Leu Leu Ile Leu Ala Thr Ile Phe Leu Gly Val
 1          5          10          15
Ile Thr Pro Ser Cys Leu Ser Glu Asn Ile Leu Tyr Ser Gly Glu Thr
 20          25          30
Leu Pro Thr Gly Gly Phe Leu Ser Ser Gly Ser Phe Val Phe Ile Met
 35          40          45
Gln Glu Asp Cys Asn Leu Val Leu Tyr Asn Val Asp Lys Pro Ile Trp
 50          55          60
Ala Thr Asn Thr Gly Gly Leu Ser Ser Asp Cys Ser Leu Ser Met Gln
 65          70          75          80
Asn Asp Gly Asn Leu Val Val Phe Thr Pro Ser Asn Lys Pro Ile Trp
 85          90          95
Ala Ser Asn Thr Asp Gly Gln Asn Gly Asn Tyr Val Cys Ile Leu Gln
100          105
Lys Asp Arg Asn Val Val Ile Tyr Gly Thr Asn Arg Trp Ala Thr Gly
115          120          125
Thr Tyr Thr Gly Ala Val Gly Ile Pro Glu Ser Pro Pro Ser Glu Lys
130          135          140
Tyr Pro Ser Ala Gly Lys Ile Lys Leu Val Thr Ala Lys
145          150          155
    
```

40 <210> 2
 <211> 157
 <212> PRT
 <213> Galanthus nivalis

45 <400> 2

```

Met Ala Lys Ala Ser Leu Leu Ile Leu Thr Thr Ile Phe Leu Gly Val
 1          5          10          15
Ile Thr Pro Ser Cys Leu Ser Glu Asn Ile Leu Tyr Ser Gly Glu Thr
 20          25          30
Leu Pro Thr Gly Gly Ser Leu Thr Ser Gly Ser Phe Val Phe Ile Met
 35          40          45
Gln Gln Asp Cys Asn Leu Val Leu Tyr Asn Val Asp Lys Pro Ile Trp
    
```

60

65

ES 2 564 138 T3

5 50 55 60
 Ala Thr Asn Thr Gly Gly Leu Ser Ser Asp Cys Ser Ile Ser Leu Gln
 65 70 75 80
 Thr Asp Gly Asp Leu Val Val Tyr Thr Pro Ser Asn Lys Pro Ile Trp
 85 90 95
 10 Ala Ser Asn Thr Asp Gly Gln Asn Gly Asn Tyr Val Cys Ile Leu Gln
 100 105 110
 Lys Asp Arg Asn Val Val Ile Tyr Gly Thr Asn Arg Trp Ala Thr Gly
 115 120 125
 15 Thr Tyr Thr Gly Ala Val Gly Ile Pro Glu Ser Pro Pro Ser Glu Lys
 130 135 140
 Tyr Pro Thr Ala Gly Met Ile Lys Leu Val Thr Ala Lys
 145 150 155

20 <210> 3
 <211> 157
 <212> PRT
 <213> Galanthus nivalis

25 <400> 3
 Met Ala Lys Ala Ser Leu Leu Ile Leu Ala Thr Ile Phe Leu Gly Val
 1 5 10 15
 Ile Thr Pro Ala Cys Leu Ser Glu Asn Ile Leu Tyr Ser Gly Glu Thr
 20 25 30
 30 Leu Pro Thr Gly Gly Phe Leu Thr Ser Gly Ser Phe Val Phe Ile Met
 35 40 45
 Gln Glu Asp Cys Asn Leu Val Leu Tyr Asn Val Asp Lys Pro Ile Trp
 50 55 60
 35 Ala Thr Asn Thr Gly Gly Leu Ser Ser Asp Cys Ser Leu Ser Met Gln
 65 70 75 80
 Thr Asp Gly Asn Leu Val Val Tyr Thr Pro Ser Asp Lys Pro Ile Trp
 85 90 95
 40 Ala Ser Asp Thr Asp Gly Gln Asn Gly Asn Tyr Val Cys Ile His Gln
 100 105 110
 Lys Asp Arg Asn Val Val Ile Tyr Gly Thr Asn Arg Trp Ala Thr Gly
 115 120 125
 45 Thr His Thr Gly Ala Val Gly Ile Pro Ala Ser Pro Pro Ser Glu Lys
 130 135 140
 Tyr Pro Thr Ala Gly Met Ile Lys Leu Val Thr Ala Lys
 145 150 155

50 <210> 4
 <211> 157
 <212> PRT
 <213> Galanthus nivalis

55 <400> 4

60

65

ES 2 564 138 T3

5 Met Ala Lys Ala Ser Leu Leu Ile Leu Ala Thr Ile Phe Leu Gly Val
 1 5 10 15
 Ile Thr Pro Ser Cys Leu Ser Glu Asn Ile Leu Tyr Ser Gly Glu Thr
 20 25 30
 Leu Pro Thr Gly Gly Phe Leu Thr Ser Gly Ser Phe Val Phe Ile Met
 35 40 45
 10 Gln Gln Asp Cys Asn Leu Val Leu Tyr Asn Ile Asp Lys Pro Ile Trp
 50 55 60
 15 Ala Thr Asn Thr Cys Gly Leu Ser Ser Asp Cys Ser Leu Ser Met Gln
 65 70 75 80
 Thr Asp Gly Asn Leu Val Val Tyr Thr Pro Ser Asn Lys Pro Ile Trp
 85 90 95
 20 Ala Ser Asn Thr Asp Gly Gln Asn Gly Asn Tyr Val Cys Ile Leu Gln
 100 105 110
 25 Lys Asp Arg Asn Val Val Ile Tyr Gly Thr Asn Arg Trp Ala Thr Gly
 115 120 125
 Thr His Thr Gly Ala Val Gly Ile Leu Ala Ser Pro Pro Ser Glu Lys
 130 135 140
 30 Tyr Pro Thr Ala Gly Met Ile Lys Leu Val Thr Ala Lys
 145 150 155

<210> 5
 <211> 157
 <212> PRT
 <213> Galanthus nivalis

30 <400> 5
 35 Met Ala Lys Ala Ser Leu Leu Ile Leu Ala Thr Ile Phe Leu Gly Val
 1 5 10 15
 Ile Thr Pro Ala Cys Leu Ser Glu Asn Ile Leu Tyr Ser Gly Glu Thr
 20 25 30
 Leu Pro Thr Gly Gly Phe Leu Thr Ser Gly Ser Phe Val Phe Ile Met
 35 40 45
 40 Gln Gln Asp Cys Asn Leu Val Leu Tyr Asn Ile Asp Lys Pro Ile Trp
 50 55 60
 45 Ala Thr Asn Thr Gly Gly Leu Ser Ser Asp Cys Ser Leu Ser Met Gln
 65 70 75 80
 Thr Asp Gly Asn Leu Val Val Tyr Asn Pro Ser Asn Lys Pro Ile Trp
 85 90 95
 50 Ala Ser Asn Thr Asp Gly Gln Asn Gly Asn Tyr Val Cys Ile Leu Gln
 100 105 110
 Lys Asp Arg Asn Val Val Ile Tyr Gly Thr Asn Arg Trp Ala Thr Gly
 115 120 125
 55 Thr His Thr Gly Ala Val Gly Ile Leu Ala Ser Pro Pro Ser Glu Lys
 130 135 140
 Tyr Pro Thr Ala Gly Met Ile Lys Leu Val Thr Ala Lys
 145 150 155

<210> 6
 <211> 160
 <212> PRT
 <213> Galanthus nivalis

60 <400> 6
 65 Met Ala Lys Ala Ser Leu Leu Ile Leu Ala Ala Ile Phe Leu Gly Val
 1 5 10 15
 Ile Thr Pro Ser Ser Pro Ser Cys Leu Gly Asp Asn Ile Leu Tyr Ser

ES 2 564 138 T3

5 Met Ala Lys Ala Ser Leu Leu Ile Leu Ala Thr Ile Phe Leu Gly Val
 1 5 10 15
 Ile Thr Pro Ala Cys Leu Ser Glu Asn Ile Leu Tyr Ser Gly Glu Thr
 20 25 30
 Leu Pro Thr Gly Gly Phe Leu Thr Ser Gly Ser Phe Val Phe Ile Met
 35 40 45
 10 Gln Gln Asp Cys Asn Leu Val Leu Tyr Asn Ile Asp Lys Pro Ile Trp
 50 55 60
 Ala Thr Asn Thr Gly Gly Leu Ser Ser Asp Cys Ser Leu Ser Met Gln
 65 70 75 80
 15 Thr Asp Gly Asn Leu Val Val Tyr Asn Pro Ser Asn Lys Pro Ile Trp
 85 90 95
 Ala Ser Asn Thr Asp Gly Gln Asn Gly Asn Tyr Val Cys Ile Leu Gln
 100 105 110
 20 Lys Asp Arg Asn Val Val Ile Tyr Gly Thr Asn Arg Trp Ala Thr Gly
 115 120 125
 Thr His Thr Gly Ala Val Gly Ile Leu Ala Ser Pro Pro Ser Glu Lys
 130 135 140
 25 Tyr Pro Thr Ala Gly Met Ile Lys Leu Val Thr Ala Lys
 145 150 155

<210> 6
 <211> 160
 <212> PRT
 <213> Galanthus nivalis

30 <400> 6
 35 Met Ala Lys Ala Ser Leu Leu Ile Leu Ala Ala Ile Phe Leu Gly Val
 1 5 10 15
 Ile Thr Pro Ser Ser Pro Ser Cys Leu Gly Asp Asn Ile Leu Tyr Ser
 20 25 30
 40 Gly Glu Thr Leu Ser Thr Gly Glu Phe Leu Asn Tyr Gly Gly Phe Val
 35 40 45
 Phe Ile Met Gln Glu Asp Cys Asn Leu Val Leu Tyr Asp Val Asp Lys
 50 55 60
 Pro Ile Trp Ala Thr Asn Thr Gly Gly Leu Ser Arg Ser Cys Phe Leu
 65 70 75 80
 45 Ser Met Gln Thr Asp Gly Asn Leu Val Val Tyr Thr Pro Ser Asn Lys
 85 90 95
 Pro Ile Trp Ala Ser Asn Thr Gly Gly Gln Asn Gly Asn Tyr Val Cys
 100 105 110
 50 Ile Leu Gln Lys Asp Arg Asn Val Val Ile Tyr Gly Thr Asp Arg Trp
 115 120 125
 Ala Thr Gly Thr Arg Thr Gly Ala Val Gly Ile Pro Ala Ser Pro Pro
 130 135 140
 55 Ser Glu Lys Tyr Pro Thr Ala Gly Lys Ile Lys Leu Val Thr Ala Lys
 145 150 155 160

60
 65

Reivindicaciones

1. Un método para analizar una vacuna conformado de los siguientes pasos:
 - 5 (a) detectar la hemaglutinina del virus de la influenza en la vacuna, o una de sus muestras, con los siguientes pasos: (i) contactar a la muestra con una lectina que es inmovilizada en un soporte sólido, para suministrar a la hemaglutinina capturada; y (ii) detectar a la hemaglutinina capturada por medio de un inmunoensayo; y
 - 10 (b) utilizar los resultados del paso (a) para calcular la concentración de hemaglutinina en la vacuna.
2. El método de la reivindicación 1, donde la lectina es una lectina de GNA.
- 15 3. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el paso (ii) es un paso cuantitativo que permite la determinación del monto y/o la concentración de hemaglutinina en la muestra.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la muestra incluye proteínas no virales excepto por las proteínas del virus de la influenza.
- 20 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la muestra incluye detergente.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la muestra es una vacuna a granel.
- 25 7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde la hemaglutinina es cuantificada en un método ELISA conformado de los siguientes pasos: (i) contactar a la muestra con una lectina que es inmovilizada en un soporte sólido, para suministrar a la hemaglutinina capturada; (ii) adherir una enzima a la hemaglutinina capturada por medio de un anticuerpo o anti-hemaglutinina; y (iii) usar la enzima adherida para convertir un sustrato a un producto, donde la detección cuantitativa del producto indica la cantidad de la hemaglutinina del virus de la influenza en la muestra.
- 30 8. Un método para suministrar una vacuna a granel con una concentración deseada de hemaglutinina, conformado de los siguientes pasos: (a) analizar la hemaglutinina en la vacuna, o en una de sus muestras, por medio del método de cualquiera de las reivindicaciones 1-7; (b) usar los resultados del paso (a) para calcular la concentración de hemaglutinina en la vacuna a granel; y (c) usar los resultados del paso (b) para diluir la vacuna a granel para generar la concentración deseada de hemaglutinina.
- 35 9. El método de la reivindicación 8, donde la concentración deseada de hemaglutinina está entre 1 y 150 µg/mililitros, por ejemplo, 90 µg/mililitros, 45 µg/mililitros, 30 µg/mililitros, 15 µg/mililitros, 10 µg/mililitros, 7.5 microgramos/mililitros, 5 µg/mililitros, 3.8 microgramos/mililitros, 3.75 µg/mililitros, 1.9 microgramos/mililitros o 1.5 microgramos/mililitros.
- 40 10. Un método para suministrar una vacuna para el uso del paciente, que se conforma de los siguientes pasos: la preparación de una vacuna a granel con una concentración deseada de hemaglutinina por medio del método de la reivindicación 8 o la reivindicación 9; y luego extrayendo una o más dosis unitarias de la vacuna provenientes del lote diluido.
- 45 11. El método de la reivindicación 10, donde una dosis unitaria extraída es empacada como un componente de un botiquín en combinación con un 2º componente de botiquín, donde el 2º componente de botiquín es un adyuvante de vacuna.
- 50 12. Un método para suministrar una vacuna adyuvante a granel conformado de los siguientes pasos: la preparación de una vacuna a granel con un contenido deseado de hemaglutinina por medio de un método de la reivindicación 8 o de la reivindicación 9; y luego la mezcla de la vacuna a granel diluida con un ayudante.
- 55 13. Un método para suministrar una vacuna adyuvante para el uso del paciente, conformado de los siguientes pasos: suministrar una vacuna adyuvante a granel por medio del método de la reivindicación 12; y luego extraer una o más dosis unitarias de la vacuna del lote.
- 60 14. Un método para purificar la hemaglutinina del virus de la influenza en una muestra, conformado de un paso en el que se contacta a la muestra con una lectina que está inmovilizada en un soporte sólido, donde la lectina es una lectina enlazadora de manosa, siempre y cuando la lectina no sea una lectina de ConA.
- 65

15. El método de la reivindicación 14, donde la lectina es una lectina de GNA.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

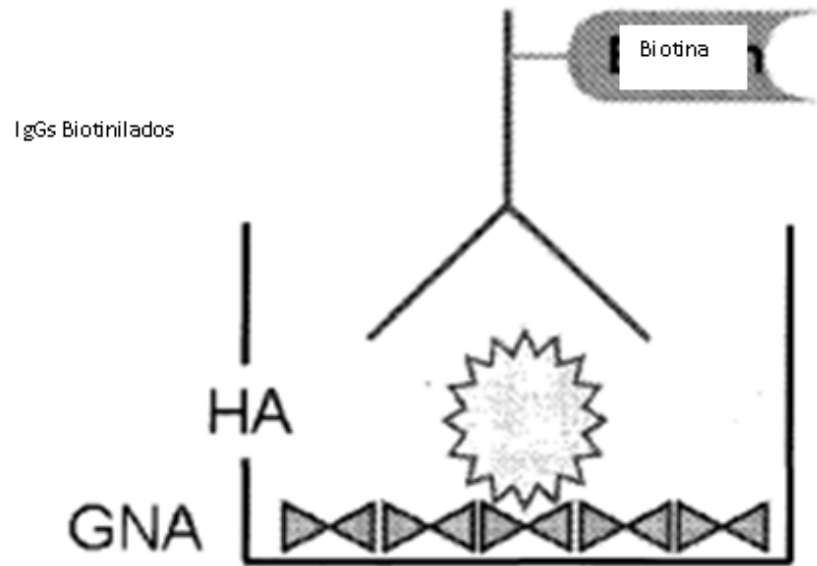


Figura 2

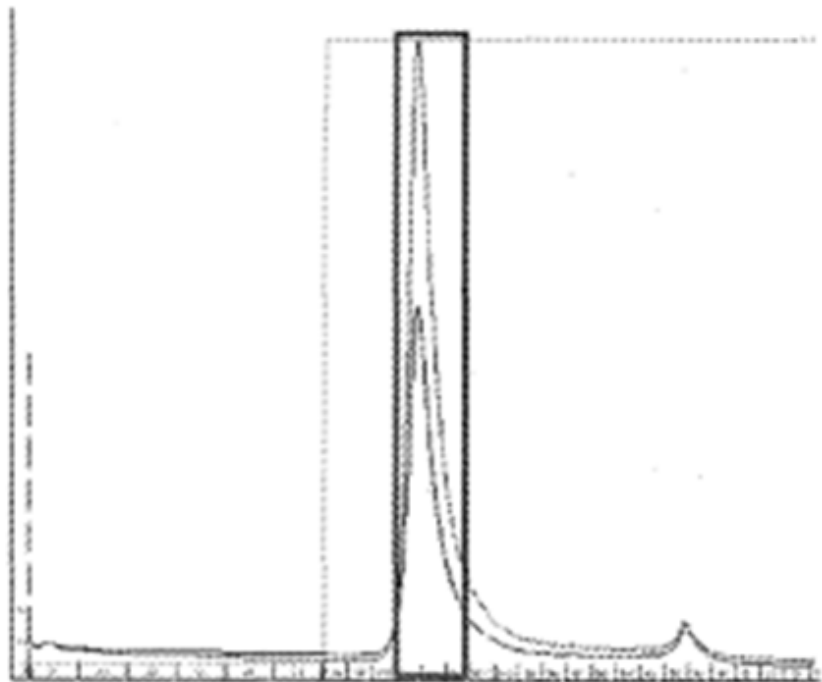


Figura 3

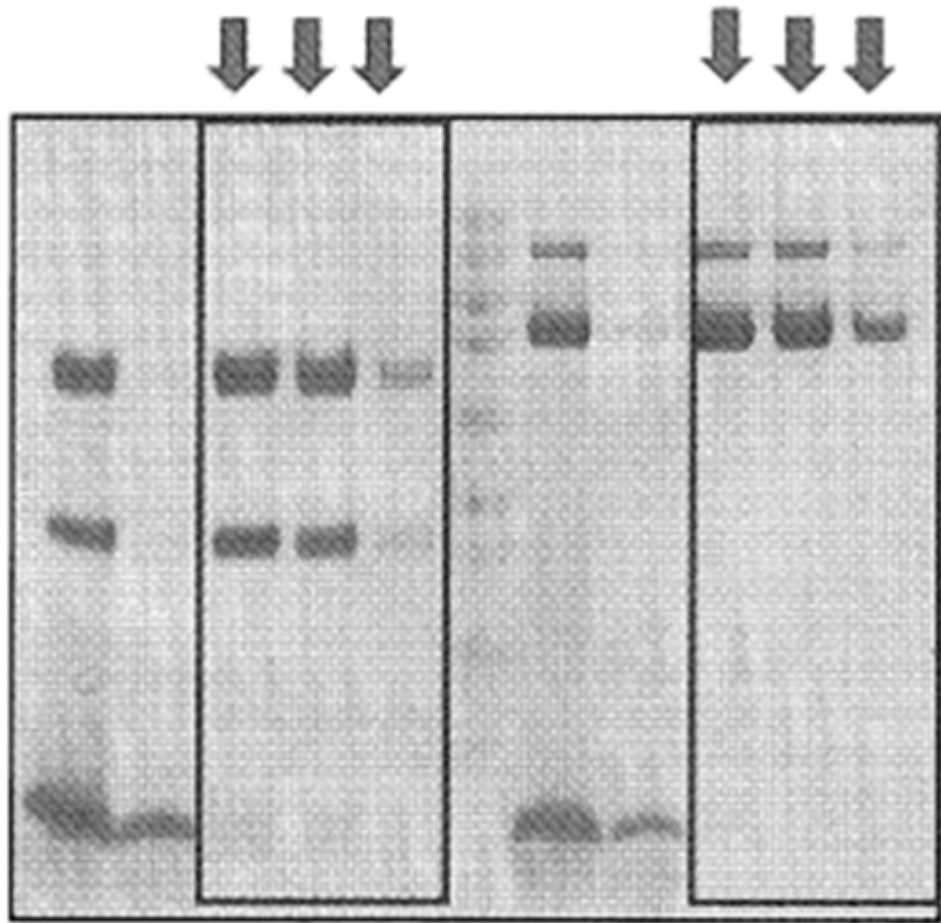


Figura 4

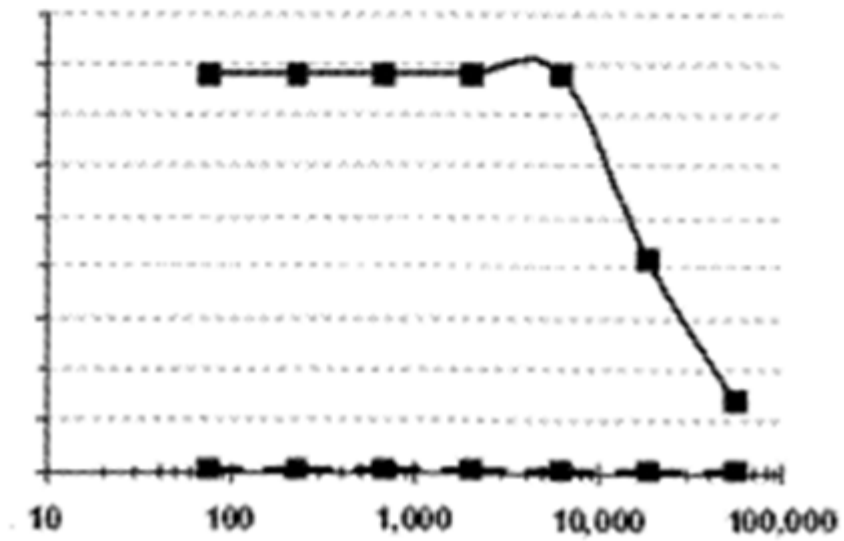


Figura 5A

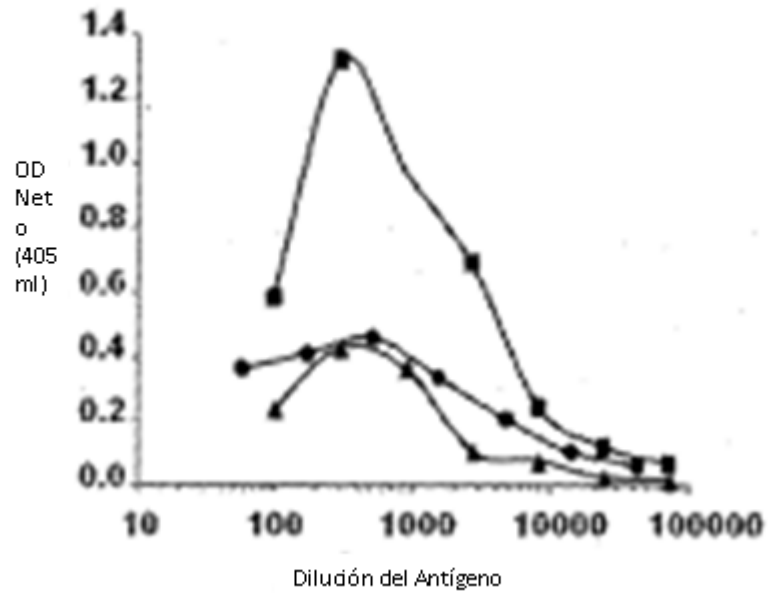


Figura 5B

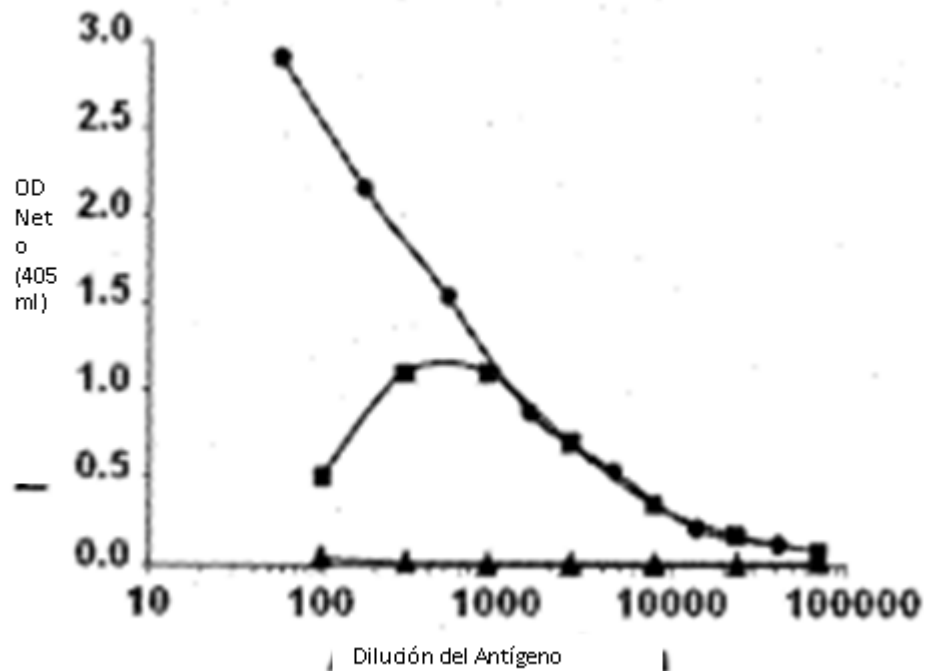


Figura 6A

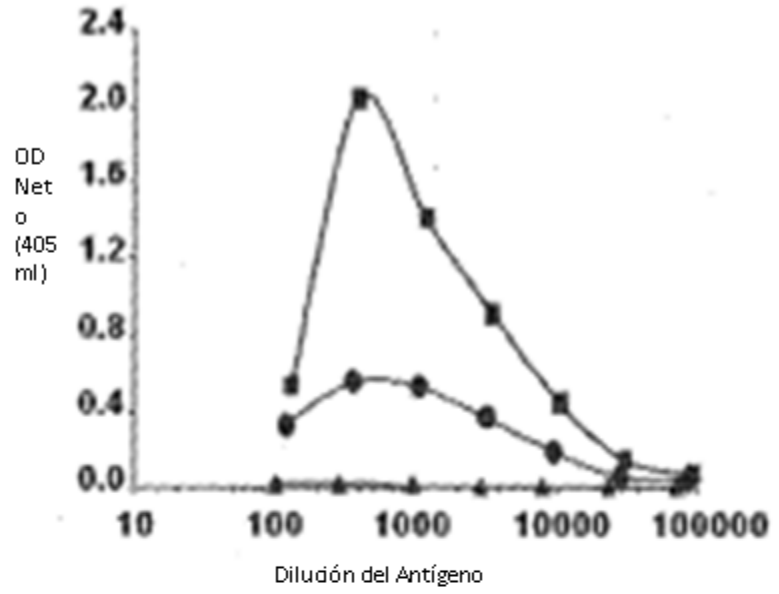


Figura 6B

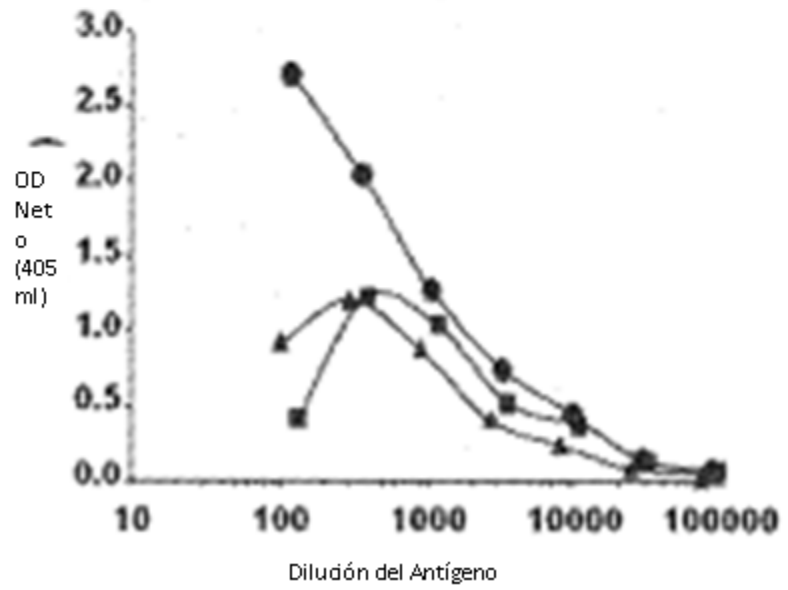


Figura 7A

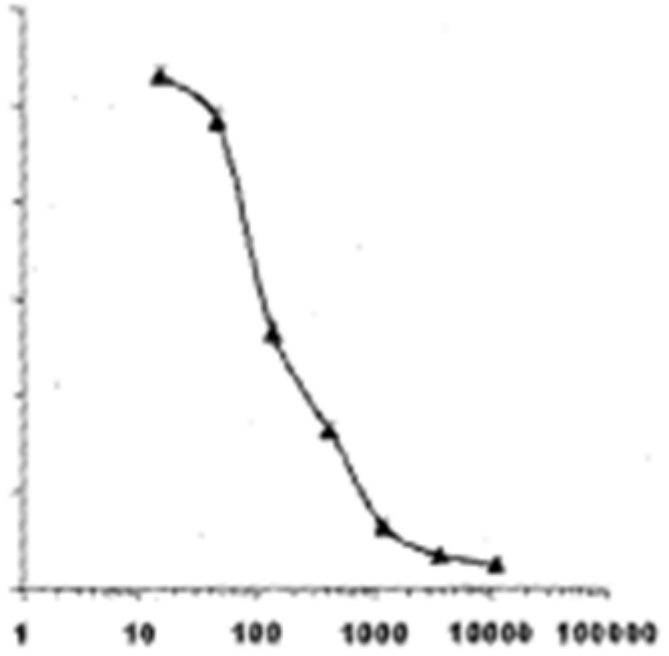


Figura 7B

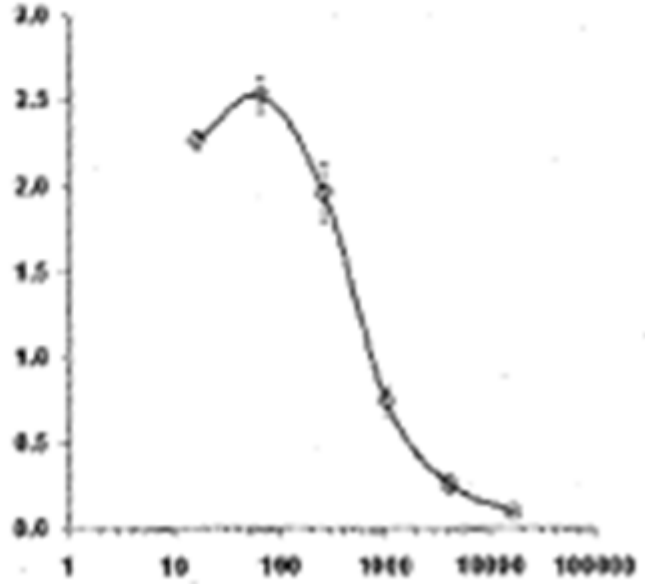


Figura 8

