

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 433**

51 Int. Cl.:

C07K 14/005 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.04.2012 PCT/US2012/034054**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.10.2012 WO12145386**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2012 E 12718003 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019 EP 2699586**

54 Título: **Procedimientos para aislar y cuantificar un antígeno de vacunas**

30 Prioridad:

21.04.2011 US 201161477835 P

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

24.10.2019

73 Titular/es:

**OLGY BIOSERVICES, INC. (100.0%)
13200 NW Nano Court
Alachua, Florida 32615, US**

72 Inventor/es:

**GRANINGER, MICHAEL y
KALIWODA, MARTIN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 728 433 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimientos para aislar y cuantificar un antígeno de vacunas

Solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reivindica beneficio de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º de serie 61/477.835, presentada el jueves 21 de abril de 2011.

Campo

La divulgación se refiere en general al campo de las vacunas y a los procedimientos para aislar y medir el contenido de antígenos de proteínas del virus en una vacuna sin un patrón conocido.

Antecedentes

10 Los virus de la gripe generalmente se dividen en tres tipos: A, B y C, según las diferencias antigénicas entre sus antígenos nucleoproteínicos y sus antígenos de proteínas de la matriz. Los virus de la gripe se dividen además en subtipos dependiendo de la naturaleza antigénica de las dos glucoproteínas de superficie del virus principal, la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA). Tanto la HA como la NA llevan epítopos antigénicos. Los anticuerpos que se producen contra la HA y la NA están asociados con la resistencia a infecciones y/o enfermedades en seres
15 humanos y animales. La eficacia de una vacuna contra la gripe está determinada en gran medida por la cantidad de HA inmunogénica en una vacuna. Por lo tanto, el principal determinante antigénico de los virus de la gripe A y B es la HA y la eficacia de una vacuna contra la gripe se determina en gran medida por la cantidad de HA inmunogénica, es decir, el contenido de antígeno, en una vacuna.

20 Hasta la fecha, el contenido de antígeno se mide con los patrones internacionales proporcionadas por los Centros Colaboradores de la Organización Mundial de la Salud (en adelante, "OMS"), que se utilizan para la determinación del valor del antígeno, por ejemplo, el contenido de HA de las vacunas. A menudo, sin embargo, los fabricantes de vacunas preparan las vacunas cuando no se dispone de patrones, por ejemplo, cuando existen diferencias antigénicas (es decir, una homología relativamente baja) entre diferentes cepas estacionales de antígenos del virus o cuando hay un brote pandémico de un virus para el que todavía no hay patrones disponibles.

25 Dicho brote pandémico ocurrió en abril de 2009, cuando hubo un brote en México, Estados Unidos y varias otras naciones de pandemia de gripe A/California/07/2009 H1N1, una nueva cepa de gripe evolucionada que combinaba genes de seres humanos, cerdos y gripe aviar, inicialmente apodada "gripe porcina". En este caso particular, se necesitaron vacunas antes de que la OMS tuviera patrones disponibles para el antígeno H1. En septiembre de 2009, la Administración de Drogas y Alimentos de EE.UU. aprobó cuatro vacunas contra el virus de la gripe H1N1 2009. En
30 el momento del desarrollo de estas vacunas, sin embargo, todavía no había patrones de la OMS disponibles para cuantificar la HA en las nuevas vacunas.

35 Durante varias décadas, el contenido de HA de las vacunas contra la gripe se ha analizado utilizando la inmunodifusión radial única (SRID o SRD, de sus siglas en inglés) con patrones internacionales proporcionadas por los Centros Colaboradores de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Estos patrones internacionales se utilizan para la determinación del valor del antígeno, por ejemplo, el contenido de HA de las vacunas. En la SRID, los viriones de la gripe se rompen con detergente y se someten a inmunodifusión durante tres días a temperatura ambiente en geles de agarosa cargados con anticuerpos. Tras la tinción del gel, se miden los diámetros de la zona de precipitación de los complejos antígeno-anticuerpo, y el contenido de antígeno de las preparaciones de virus de un cierto subtipo se calcula utilizando una curva de calibración obtenida con un lote de referencia de virus completo de este subtipo con un
40 contenido de HA conocido. Sin embargo, la SRID es un ensayo laborioso y de bajo rendimiento. Además, la sensibilidad, exactitud y precisión, especialmente para el virus de la gripe no purificado (en proceso) es relativamente bajo.

45 Kapteyn y col. (Vaccine 24:3137-44, 2006; "Kapteyn") publicó un ensayo de RP-HPLC para la cuantificación de la HA en cultivos del virus de la gripe, así como para la identificación de la HA de cepas individuales de gripe en vacunas trivalentes. Sin embargo, el procedimiento de Kapteyn no cuantificó la HA sin un patrón. Adicionalmente, Kapteyn usó detergente para solubilizar el antígeno y la alquilación para evitar que las proteínas con grupos sulfhidrilo reactivos se vuelvan a asociar y formen complejos. De hecho, en el procedimiento de Kapteyn, la HA se aisló completamente mediante la disolución de las membranas a través del uso de un detergente fuerte. También se describe que el procedimiento de Kapteyn no es adecuado para cuantificar HA de cepas de gripe inactivadas con formalina.

50 Phelan y Cohen (J. Chromatography 266:55-66, 1983) desvelan un procedimiento para separar las proteínas principales de una muestra viva del virus de la gripe mediante cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa.

55 Por lo tanto, la técnica hasta la fecha no desvela procedimientos para determinar de manera precisa y eficaz la concentración de antígeno HA en muestras de HA sin analizar o purificadas, especialmente en muestras que no se procesan con detergentes o agentes alquilantes y en ausencia de patrones de proteína HA según lo proporcionado por los centros colaboradores de la OMS. Claramente, existe una gran necesidad en la técnica de procedimientos

sólidos, exactos y rápidos para el aislamiento y la cuantificación fiables del antígeno, incluidos los antígenos del virus, como la HA, en la fabricación de vacunas antes de que los centros colaboradores de la OMS dispongan de los patrones de antígenos. La siguiente divulgación describe los detalles de dichos procedimientos.

Sumario

5 La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

Los procedimientos descritos en el presente documento se desarrollaron para proporcionar un medio para medir el contenido de antígeno de proteína del virus en una vacuna que comprende virus en ausencia de los patrones de antígeno disponibles. Por lo tanto, la invención aborda una o más necesidades en la técnica relacionadas con la cuantificación rápida y exacta de la concentración de antígeno en una vacuna durante el desarrollo y el proceso de fabricación de la vacuna sin la necesidad de patrones internacionales. Por lo tanto, los procedimientos proporcionados en el presente documento permiten a los fabricantes de vacunas producir más rápidamente una vacuna que se puede entregar al público sin esperar a que la OMS desarrolle y proporcione un patrón.

Más específicamente, la invención proporciona procedimientos rápidos y sólidos para aislar y cuantificar con exactitud antígenos de vacunas, que son exactos y reproducibles, en ausencia del uso de patrones. La divulgación es aplicable para su uso con una variedad de antígenos, proporcionando así un procedimiento mejorado en la técnica de fabricación de vacunas hasta la fecha.

La invención proporciona procedimientos para aislar un antígeno de proteína del virus de una composición de vacuna que comprende virus, comprendiendo el procedimiento las etapas de: (a) solubilizar el antígeno en la composición de vacuna mediante reducción sin un detergente y sin un agente alquilante, en la que la reducción comprende una temperatura de incubación de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 90 °C; (b) acidificación del antígeno para evitar la formación de enlaces disulfuro entre los subtipos de antígenos separados; y (c) aislar el antígeno o un subtipo de antígeno mediante fraccionamiento.

En algunos aspectos, la reducción comprende tratar la composición de vacuna con ditioneitol. En algunos aspectos, la reducción comprende un tiempo de incubación de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 20 horas. En otros aspectos, la reducción comprende un tiempo de incubación de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 2 horas. En aspectos más particulares, la reducción comprende un tiempo de incubación de aproximadamente 1 hora. En aspectos adicionales, determinados aspectos, la reducción comprende una temperatura de incubación de aproximadamente 85 °C. En otros aspectos, la etapa de reducción está controlada por pH. En diversos aspectos, la reducción se lleva a cabo a un pH de aproximadamente pH 6 a aproximadamente pH 11. En aspectos particulares, la reducción se lleva a cabo a un pH de aproximadamente pH 7 a aproximadamente pH 10. En aspectos adicionales, la etapa de solubilización comprende adicionalmente la desnaturalización con un agente caótopo. En diversos aspectos, el agente caótopo es clorhidrato de guanidina, urea, tiourea, litio, perclorato o tiocianato. En diversos aspectos, la acidificación se lleva a cabo con ácido fosfórico, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido trifluoroacético, ácido pentafluoropropiónico, ácido heptafluorobutírico o ácido fórmico.

En algunos aspectos, el fraccionamiento se lleva a cabo mediante cromatografía. En diversos aspectos, la cromatografía es cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), HPLC de fase inversa (RP-HPLC), HPLC de intercambio iónico (I EX-HPLC), cromatografía de afinidad, cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) o cromatografía de exclusión de tamaño (SEC). En un aspecto ejemplar, la cromatografía es HPLC de fase inversa (RP).

La invención proporciona además procedimientos para cuantificar el antígeno de proteína del virus o el subtipo de antígeno en una composición de vacuna que comprende virus. Dichos procedimientos incluyen todos los procedimientos descritos anteriormente en el presente documento para aislar un antígeno de una composición de vacuna, con una etapa adicional de cuantificación del antígeno o subtipo de antígeno. En aspectos ejemplares, la etapa de cuantificación se lleva a cabo sin utilizar un patrón de antígeno. En diversos aspectos, la etapa de cuantificación comprende cuantificar el antígeno mediante análisis de aminoácidos. En determinados aspectos, el antígeno es hemaglutinina (HA). En aspectos particulares, la HA es de una composición de vacuna del virus de la gripe, una composición de vacuna del virus del sarampión, una composición de vacuna del virus paragripal o una composición de vacuna del virus de las paperas. En algunos aspectos, la composición de vacuna es una composición de vacuna del virus de la gripe. En aspectos adicionales, la composición de vacuna del virus de la gripe proporciona protección contra un virus de la gripe seleccionado del grupo que consiste en la gripe A y la gripe B. En diversos aspectos, el subtipo de antígeno es uno cualquiera de la gripe A HA1, HA2, HA3, HA4, HA5, HA6, HA7, HA8, HA9, HA10, HA11, HA12, HA13, HA14, HA15 y HA16 y la gripe B HA. En determinados aspectos, el subtipo de antígeno es el subtipo HA1, HA2, HA3, HA5, HA7, HA9, HA10 de la gripe A o HA de la gripe B. En un aspecto ejemplar, el subtipo de la gripe A HA es HA1. En aspectos adicionales, la composición de vacuna de la gripe proporciona protección contra un tipo de gripe seleccionado del grupo que consiste en la gripe A H1N1, H1N2, H2N2, H3N2, H5N1, H7N1, H7N2, H7N3, H7N7, H9N2, H10N7y la gripe B. En diversos aspectos, el procedimiento cuantifica el contenido de antígeno con una desviación estándar relativa (RSD) de menos de aproximadamente el 2,5 %. En aspectos más particulares, la RSD es de aproximadamente el 2,2 %. En aspectos aún más particulares, la RSD es de aproximadamente el 1,3%.

El resumen anterior no pretende definir todos los aspectos de la divulgación, y los aspectos adicionales se describen

en otras secciones, como la siguiente descripción detallada. Se pretende que todo el documento se relacione como una divulgación unificada, y debe entenderse que se contemplan todas las combinaciones de características descritas en el presente documento, incluso si la combinación de características no se encuentra junta en la misma oración o párrafo o sección del presente documento. Otras características y ventajas de la invención se harán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada.

Descripción detallada

La divulgación proporciona un nuevo procedimiento para aislar y preparar el antígeno y determinar la concentración de antígeno en el desarrollo y la fabricación de vacunas en ausencia de patrones internacionales, por ejemplo, los patrones internacionales de la Organización Mundial de la Salud (OMS), que son preparaciones de referencia biológica con actividad biológica definida. El procedimiento incluye mejoras sobre la técnica anterior mediante la solubilización del antígeno de proteína del virus en una composición de vacuna sin el uso de detergente y sin el uso de alquilación. El antígeno solubilizado se separa luego mediante fraccionamiento y se cuantifica mediante análisis cuantitativo de aminoácidos.

La disponibilidad oportuna de los patrones internacionales de la OMS sirve como base para la comparación de mediciones biológicas en la fabricación de vacunas en todo el mundo. Sin embargo, estos patrones internacionales de la OMS no están disponibles cuando se produce un brote de un nuevo virus y es necesario preparar los patrones. El problema hasta la fecha es que los fabricantes de vacunas se ven obligados a desarrollar y producir rápidamente una nueva vacuna en respuesta a un brote de un nuevo virus mientras esperan la entrega de los patrones Internacionales de la OMS para cuantificar el antígeno en su nueva vacuna. Los procedimientos de la presente divulgación proporcionan una solución a este problema al proporcionar un nuevo procedimiento para cuantificar el antígeno sin la necesidad de los patrones internacionales de la OMS.

Otro problema hasta la fecha con los procedimientos para la separación y recuperación de antígenos procedentes de patógenos es que la separación del antígeno de otras proteínas no es óptima. En la técnica, ha habido una resolución deficiente de los máximos de proteína de antígeno de interés, la recuperación fue baja y no cuantitativa, y los tiempos de preparación de la muestra fueron más largos. La presente divulgación resuelve muchos de estos problemas mediante la utilización de cromatografía para aislar el antígeno en una muestra que se desnaturaliza y reduce sin el uso de un detergente y, en aspectos ejemplares, sin alquilación para proteger los grupos sulfhidrilo en el antígeno. Por lo tanto, el tiempo de preparación de la muestra se reduce considerablemente con menos reacciones secundarias. Después del aislamiento del antígeno mediante cromatografía, la concentración del antígeno se cuantifica sin el uso de un patrón internacional. En aspectos más particulares, el análisis cuantitativo de aminoácidos se lleva a cabo como un procedimiento alternativo de cuantificación de antígenos.

El problema a resolver a partir de la técnica anterior era proporcionar un procedimiento exacto, rápido y sólido que fuera aplicable para la separación, purificación y cuantificación de alto rendimiento de un antígeno. En aspectos más particulares, el problema a resolver era proporcionar dicho procedimiento sin el uso de detergentes, sin la necesidad de alquilación y sin la necesidad de patrones de antígenos. Los procedimientos descritos en el presente documento muestran que el antígeno hemaglutinina (HA), y especialmente el determinante principal HA1, se separa extremadamente bien y con alta pureza de las otras proteínas presentes en la preparación y permite que un experto en la técnica determine la cantidad de antígeno presente en la preparación, ya sea mediante la comparación con otros valores (conocidos), con patrones internos o mediante análisis cuantitativo de aminoácidos.

Más particularmente, la divulgación se refiere a un nuevo procedimiento para separar antígenos HA, comprendiendo el procedimiento las etapas de aplicar una preparación de antígeno solubilizado sin detergente y fraccionar el antígeno, en un aspecto, en una columna de cromatografía. La divulgación, en determinados aspectos, incluye además la elución del antígeno HA de la columna, incluso, en otros aspectos, la cuantificación del antígeno mediante AAA.

Antes de que se explique en detalle cualquier realización de la divulgación, sin embargo, debe entenderse que la divulgación no está limitada en su solicitud a los detalles de construcción y la disposición de los componentes expuestos en la siguiente descripción o ilustrados en las figuras y ejemplos. Los encabezados de sección utilizados en el presente documento son solo para fines organizativos y no deben interpretarse como limitantes de la materia objeto.

La divulgación abarca otras realizaciones y se practica o se lleva a cabo de varias maneras. Asimismo, debe entenderse que la fraseología y la terminología utilizadas en el presente documento tienen el fin de describir y no deben considerarse como limitativas. Los términos "que incluye", "que comprende", o "que tiene" y las variaciones de los mismos están destinados a abarcar los artículos enumerados a continuación y equivalentes de los mismos, así como los artículos adicionales.

Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que un experto en la materia a la que la presente divulgación pertenece entiende habitualmente.

Las siguientes abreviaturas se utilizan en todo.

5	AA	Aminoácidos
	AAA	Análisis de aminoácidos
	ADN	Ácido desoxirribonucleico
	EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
	HA	Hemaglutinina
10	HA1-16	Subtipos de hemaglutinina 1-16
	HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento
	HIC	Cromatografía de interacción hidrófoba
	IEX-HPLC	HPLC de intercambio iónico
	KDa	KiloDaltons
15	LC-MS/MS	Cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem
	MALDI/TOF	Ionización de desorción láser asistida por matriz/espectrometría de masas de tiempo de vuelo MVB volumen monovalente
	RSD	Desviación estándar relativa
	RP-HPLC	HPLC de fase inversa
20	SDS	Dodecilsulfato de sodio
	SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
	SEC	Cromatografía de exclusión por tamaño
	SRD	Inmunodifusión radial simple
	UV	Ultravioleta

25 Cabe destacar en el presente documento que, tal como se usa en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una", y "el/la" incluyen referencias en plural, a menos que el contexto indique claramente otra cosa.

Tal como se usa en el presente documento, los siguientes términos tienen los significados que se les asigna a menos que se especifique otra cosa.

30 Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de restos de aminoácidos unidos a través de enlaces peptídicos. "Proteína" se refiere normalmente a polipéptidos grandes. "Péptidos" se refiere normalmente a polipéptidos pequeños.

También se entiende específicamente que cualquier valor numérico recitado en el presente documento incluye todos los valores desde el valor inferior al valor superior, es decir, todas las combinaciones posibles de valores numéricos entre el valor más bajo y el valor más alto enumerado deben considerarse expresamente declaradas en esta solicitud. Por ejemplo, si se establece un intervalo de concentración de aproximadamente el 1 % al 50 %, se pretende que valores como del 2 % al 40 %, del 10 % al 30 % o del 1 % al 3 %, etc., se enumeren expresamente en la presente memoria descriptiva. Los valores enumerados anteriormente son solo ejemplos de lo que se pretende específicamente.

40 Los intervalos, en diversos aspectos, se expresan en el presente documento a partir de "aproximadamente" o "en torno a" un valor particular y/o de "aproximadamente" o "en torno a" otro valor particular. El término "casi" también se usa de manera intercambiable con el término "aproximadamente". Cuando los valores se expresan como aproximaciones, mediante el uso del antecedente "aproximadamente", se entenderá que se incluye cierta variación en el intervalo e incluye valores de +/- 10 %, +/- 5 % y +/- 1,0 % del valor desvelado o recitado.

45 "Gripe" se refiere a cualquiera de los tres tipos de virus de la gripe, A, B y C en la familia de *Orthmyxoviridae*. Solo la gripe A y B conducen a brotes estacionales. Los virus de la gripe infectan a su hospedador mediante la unión a través de la hemaglutinina (HA) a los azúcares del ácido siálico en las superficies de las células epiteliales, normalmente en la nariz, garganta y pulmones de mamíferos y en los intestinos de las aves.

50 El género de la gripe A tiene una especie, el virus de la gripe A. La gripe A se divide en subtipos o serotipos basados en las propiedades serológicas de la proteína HA (H1-16) y la proteína neuraminidasa (N1-9). Los subtipos de gripe se nombran de acuerdo con la combinación de hemaglutinina y neuraminidasa, por ejemplo, HxNy. Los subtipos que se han confirmado en seres humanos, ordenados por el número de muertes pandémicas humanas conocidas, incluyen, aunque no de forma limitativa, H1N1, H2N2, H3N2, H5N1, H7N7, H1N2, H9N2, H7N2, H7N3 y H10N7. El género de la gripe B tiene una especie, el virus de la gripe B. La gripe B muta a una velocidad de 2 a 3 veces más lenta que la del tipo A y, por lo tanto, es menos diversa genéticamente, con solo un serotipo de gripe B. El género de la gripe C tiene una especie, el virus de la gripe C, que infecta a seres humanos, perros y cerdos, causando a veces enfermedades graves y epidemias locales. Sin embargo, la gripe C es menos habitual que los otros tipos.

El término "antígeno" o "subtipo de antígeno" se refiere a una molécula o una porción de una molécula capaz de unirse mediante un agente de unión selectiva, como un anticuerpo y, adicionalmente, capaz de usarse en un sujeto para producir anticuerpos capaces de unirse a un epítipo de cada antígeno. Un antígeno, en diversos aspectos, tiene uno o más epítopos. En un aspecto ejemplar, la HA es el antígeno. LA HA es una glucoproteína antigénica que es responsable de unir el virus a la célula que se está infectando. Hay al menos 17 antígenos HA diferentes identificados hasta la fecha, etiquetados como HA1-HA16 o, alternativamente, H1-H16 para la gripe A, y al menos un antígeno HA conocido para la gripe B. H1, H2 y H3, se encuentran habitualmente en seres humanos. El antígeno HA de la gripe A y la gripe B se encuentra habitualmente en la gripe B humana. La divulgación incluye procedimientos para aislar y cuantificar todas las proteínas HA de virus conocidas y aún desconocidas, que incluyen, pero sin limitación a cualquiera de HA1, HA2, HA3, HA4, HA5, HA6, HA7, HA8, HA9, HA10, HA11, HA12, HA13, HA14, HA15, HA16 y HA de la gripe B.

La expresión "contenido de antígeno" o "concentración de antígeno" se refiere a la cantidad de antígeno, es decir, la concentración de antígeno, en una muestra de vacuna.

Los términos "vacuna" o "composición de vacuna" se refieren a una preparación biológica que mejora la inmunidad a una enfermedad en particular (por ejemplo, la gripe). Los términos "vacuna" o "composición de vacuna" se usan indistintamente en el presente documento para describir todas las formulaciones de vacuna, incluidas las preparaciones de procedimiento instantáneo, previo y posterior implicadas en el desarrollo y fabricación de vacunas.

El término "patrón" o "patrón internacional" o "patrón de referencia internacional" o "patrón de antígeno" se refiere a una preparación de referencia biológica con actividad biológica definida según lo dispuesto por una autoridad reguladora, por ejemplo, mediante la Organización Mundial de la Salud (OMS) o un Centro Colaborador de la OMS.

"Desviación estándar relativa", "RSD," o "% de RSD" es el valor absoluto del coeficiente de variación. A menudo se expresa como un porcentaje. Un término similar que a veces se usa es la varianza relativa que es el cuadrado del coeficiente de variación. Asimismo, el error estándar relativo es una medida de la fiabilidad de una estimación estadística obtenida al dividir el error estándar por la estimación; luego se multiplica por 100 para ser expresado como un porcentaje. La RSD se usa ampliamente en química analítica para expresar la precisión y la repetibilidad de un ensayo. $RSD = (\text{desviación estándar de la matriz } X) \times 100 / (\text{promedio de la matriz } X)$.

Los encabezados de sección se utilizan en el presente documento solo para fines organizativos y no deben interpretarse como limitantes de ningún modo de la materia objeto.

Aislamiento del antígeno de una vacuna

La divulgación incluye procedimientos para aislar antígenos de proteínas de virus que incluyen, pero sin limitación, antígenos HA de una composición de vacuna que comprende virus. En realizaciones ejemplares, la vacuna del virus de la gripe se obtiene a partir de un procedimiento previo, instantáneo o posterior de un material procedente de huevo o de material del virus de un cultivo celular. El antígeno se solubiliza luego de la composición de vacuna sin detergente.

La solubilización de antígenos, también conocida como desintegración de virus, implica la descomposición del virus mediante procedimientos químicos o físicos para aislar un antígeno o antígenos para su posterior aislamiento y cuantificación. En un aspecto ejemplar, la etapa de solubilización se lleva a cabo mediante la reducción sin el uso de detergente. Los detergentes no se utilizan en los procedimientos descritos en el presente documento porque se unen a proteínas y alteran sus propiedades, es decir, los detergentes contaminan el antígeno aislado e interfieren con la separación cromatográfica necesaria para la determinación precisa de la concentración de antígeno.

Por lo tanto, la solubilización de antígenos se lleva a cabo mediante cualquier agente reductor que no sea un detergente que reduzca los enlaces disulfuro de las proteínas. Los agentes reductores adecuados incluyen, aunque no de forma limitativa, ditioneol (DTT), tris [2-carboxietil] hidrocloreto de fosfina (TCEP), Protein-S-S-Reductant™ (G Biosciences®, Maryland Heights, MO), β3-mercaptoetanol, β3-mercaptoetilamina, tiopropil-agarosa, borohidruro de sodio, cianoborohidruro de sodio, fosforotioato de sodio, sulfito y agentes generadores de sulfito, ditioeritritol, tributilfosfina, glutatión, tioglicolato, 2;3-dimercaptopropanol o ácido perfórmico. En diversos aspectos, el clorhidrato de guanidina u otro agente caótopo tal como, pero sin limitación, urea, tiourea, litio, perclorato y tiocianato también se usa en el tampón de reacción de solubilización. Un agente caótopo desnaturaliza la proteína pero no precipita la proteína. Los compuestos y procedimientos para llevar a cabo la reducción de proteínas son bien conocidos por los expertos en la técnica. Las soluciones y condiciones de reducción específicas se describen con más detalle en el presente documento en los Ejemplos.

En un aspecto ejemplar, un tampón reductor o un agente reductor reduce los enlaces disulfuro entre moléculas de HA en las respectivas subunidades, por ejemplo, HA1 y HA2, y libera, por ejemplo, HA1 del virus. En determinados aspectos, el DTT se utiliza a una concentración de aproximadamente 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, 15 mM, 16 mM, 17 mM, 18 mM, 19 mM, 20 mM, 21 mM, 22 mM, 23 mM, 24 mM, 25 mM, 26 mM, 27 mM, 28 mM, 29 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM, 50 mM, 55 mM, 60 mM, 65 mM, 70 mM, 80 mM, 85 mM, 90 mM, 95 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM, 300 mM, 350 mM, 400 mM, 450 mM o 500 mM. En aspectos más particulares, el DTT se utiliza a una concentración, por ejemplo, que varía de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 100 mM.

En un aspecto ejemplar, la reducción comprende un tiempo de incubación de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 20 horas, de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 10 horas o de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 2 horas. En aspectos, los tiempos de incubación son de aproximadamente 1 hora. Por lo tanto, los tiempos de incubación son de aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 40 minutos, aproximadamente 50 minutos, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 1,5 horas, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 2,5 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 3,5 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 4,5 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 5,5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 6,5 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 7,5 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 8,5 horas, aproximadamente 9 horas, aproximadamente 9,5 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 11 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 13 horas, aproximadamente 14 horas, aproximadamente 15 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 17 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 19 horas o aproximadamente 20 horas. Los tiempos de reducción específicos se describen con más detalle en el presente documento en los Ejemplos.

La reducción comprende una temperatura de incubación de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 90 °C. En aspectos más particulares, la reducción comprende una temperatura de incubación de aproximadamente 85 °C. Por lo tanto, las temperaturas de incubación son de aproximadamente 50 °C, aproximadamente 55 °C, aproximadamente 60°C, aproximadamente 65°C, aproximadamente 70°C, aproximadamente 75°C, aproximadamente 80°C, aproximadamente 85 °C o aproximadamente 90 °C. Las temperaturas de reducción específicas se describen con más detalle en el presente documento en los Ejemplos.

En aspectos adicionales, la reducción del antígeno está controlada por el pH. En diversos aspectos, la reacción de reducción se lleva a cabo a un pH de aproximadamente pH 6 a aproximadamente pH 11. En aspectos particulares, el pH es de aproximadamente pH 7 a aproximadamente pH 10. En aspectos más particulares, el pH es aproximadamente 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 y 10,0.

La reducción se lleva a cabo sin alquilación. La alquilación protege los grupos sulfhidrilo de las proteínas después de la reducción y evita la reacción inversa de las cisteínas libres. Por lo tanto, la alquilación se usa normalmente para evitar la reasociación y/o la formación de complejos de antígenos HA separados, por ejemplo, HA1 y HA2, y otras proteínas. El uso de agentes alquilantes, como la 4-vinilpiridina, sin embargo, disminuyó la pureza de la proteína como se describe con más detalle en el presente documento en los Ejemplos. Por lo tanto, para evitar la reasociación y/o la formación de complejos de antígenos separados, por ejemplo, HA1 y HA2, y otras proteínas, los grupos sulfhidrilo de todas las proteínas están protegidos sin el uso de un agente alquilante.

Para evitar la reasociación y/o la formación de complejos de antígenos separados y otras proteínas sin el uso adicional de un agente alquilante, los grupos de proteínas sulfhidrilo reducidos se protegen por protonación mediante acidificación. La acidificación previene la formación de enlaces disulfuro debido a que para que se formen enlaces disulfuro, un grupo sulfhidrilo debe estar al menos parcialmente en forma iónica. La acidificación es un tratamiento simple y eficaz, en el que el pH se controla y ajusta para evitar la precipitación del antígeno. En diversos aspectos, la acidificación se lleva a cabo con ácido fosfórico, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido trifluoroacético, ácido pentafluoropropiónico, ácido heptafluorobutírico o ácido fórmico. En aspectos ejemplares, la acidificación se lleva a cabo con ácido fosfórico; sin embargo, el uso de ácido fosfórico no es limitante, ya que se utilizan todos los demás procedimientos de acidificación en la técnica. Los procedimientos para la acidificación son bien conocidos en la técnica y no se detallan en el presente documento. Las soluciones y condiciones de acidificación específicas se describen con más detalle en el presente documento en los Ejemplos.

Fraccionamiento de antígenos

Después de la reducción y acidificación, el antígeno se aísla mediante fraccionamiento. En aspectos ejemplares, el fraccionamiento se lleva a cabo mediante cromatografía. Se usa cualquier tipo de cromatografía adecuada conocida en la técnica. Por ejemplo, dichos tipos adecuados de cromatografía incluyen, aunque no de forma limitativa, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), HPLC de fase inversa (RP-HPLC), HPLC de intercambio iónico (EX-HPLC), cromatografía de afinidad, cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) o cromatografía de exclusión de tamaño (SEC).

En algunos aspectos, el fraccionamiento de antígenos se lleva a cabo mediante RP-HPLC. Por lo tanto, los tipos adecuados de columnas de fase inversa incluyen, aunque no de forma limitativa, columnas de sílice o columnas basadas en polímeros, porosas, no porosas o monolíticas, con varias modificaciones que varían de C2 a C18. El diámetro de la columna adecuado para fines analíticos es normalmente, pero sin limitación, un intervalo de aproximadamente 75 µm a aproximadamente 5 mm, dependiendo del caudal, que puede variar de aproximadamente 0,1 µl/min a aproximadamente 5 ml/min. Para el aislamiento de una cantidad suficiente de antígeno, se utilizan normalmente columnas con un diámetro de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 10 mm. Las proteínas se separan y se eluyen de las columnas de fase inversa con mezclas de disolventes acuosos y orgánicos tales como, pero sin limitación, acetonitrilo, metanol, etanol, butanol, propanol, isopropanol y tetrahidrofurano, y con frecuencia contienen modificadores tales como, pero sin limitación, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido trifluoroacético, ácido

5 pentafluoropropiónico, ácido heptafluorobutírico, ácido fórmico, ácido fosfórico y tampones de fosfato. Los procedimientos para la HPLC en fase inversa de proteínas son bien conocidos en la técnica y no se elaboran en el presente documento adicionalmente, ya que se pueden llevar a cabo por un experto en la materia. Los procedimientos y condiciones específicos de HPLC en fase reversa se describen con más detalle en el presente documento en los Ejemplos.

10 El fraccionamiento de antígenos mediante cromatografía, como se describe en el presente documento en los Ejemplos, proporcionó una excelente linealidad y precisión con una desviación estándar relativa baja (RSD). La linealidad, la capacidad (dentro de un cierto intervalo) para obtener resultados de prueba que son directamente proporcionales a la concentración (cantidad) de analito en la muestra, es importante en cualquier procedimiento analítico. La precisión de un procedimiento analítico expresa la proximidad del acuerdo (grado de dispersión) entre una serie de mediciones obtenidas a partir de un muestreo múltiple de la muestra homogénea en las condiciones prescritas. La precisión, en diversos aspectos, se considera en tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.

Cuantificación de antígenos

15 Los procedimientos para cuantificar el antígeno o el subtipo de antígeno después del aislamiento mediante fraccionamiento sin el uso de patrones internacionales se incluyen en la divulgación. Los procedimientos adecuados para cuantificar el antígeno fraccionado incluyen, aunque no de forma limitativa, el análisis de aminoácidos (AAA), la determinación de nitrógeno (Kjeldahl), la espectrometría de masas y la espectrometría de masas con dilución de isótopos.

20 En un aspecto ejemplar, la concentración de antígeno se determina utilizando AAA. El AAA se refiere al procedimiento utilizado para determinar la composición de aminoácidos y/o cuantificar la concentración de antígeno en una composición basada en el peso molecular del antígeno y los aminoácidos. El AAA se lleva a cabo utilizando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica. El AAA es una herramienta adecuada para la determinación precisa de cantidades de proteínas, pero también proporciona información detallada sobre la composición relativa de aminoácidos y aminoácidos libres. Véase Amino Acid Analysis Protocols: Methods in Molecular Biology. Volumen 159 (editado por Cooper y col., © 2001 Humana Press Inc., Totawa, NJ). La composición relativa de aminoácidos proporciona un perfil característico para las proteínas, que a menudo es suficiente para la identificación de una proteína. A menudo se utiliza como soporte de decisión para la elección de proteasas para la fragmentación de proteínas.

30 Normalmente, el AAA incluye hidrólisis y, luego, separación, detección y cuantificación. La hidrólisis o "hidrólisis ácida" se logra normalmente mediante condiciones ácidas. Por ejemplo, un procedimiento estándar es la hidrólisis con ácido clorhídrico 6 M (24 horas, 110 °C). Este procedimiento estándar es un compromiso entre el requisito de tiempo y la temperatura y se puede modificar por un experto en la técnica. En aspectos ejemplares, se lleva a cabo un estudio del tiempo de hidrólisis para determinar el tiempo óptimo de hidrólisis para HA. El tiempo de hidrólisis se puede optimizar, sin embargo, para cada antígeno individual que se cuantifica de acuerdo con los procedimientos de la divulgación. Los procedimientos para el AAA son bien conocidos en la técnica y los productos para el AAA están disponibles comercialmente (kit AccQ Tag (Waters, N.º WAT052880) y Sigma-Aldrich). En algunas realizaciones, se utilizan columnas de HPLC Zorbax Eclipse AAA. Un experto en la técnica es consciente de diversos procedimientos para llevar a cabo el AAA. Los procedimientos específicos del AAA se describen con más detalle en el presente documento en los Ejemplos.

40 Basándose en la secuencia conocida para un antígeno particular, se calcula el número teórico de aminoácidos por molécula de antígeno y, posteriormente, la cantidad molar de antígeno por inyección. La masa molecular de antígeno calculada o medida y los factores de dilución aplicados durante la preparación de la muestra permiten el cálculo de la concentración de antígeno en la muestra, expresada como µg de antígeno por ml de muestra.

45 En un aspecto ejemplar, a continuación se proporciona en el presente documento una fórmula para calcular la concentración de HA.

$$n_{HA1} = n_{aa}/X_{aa}$$

n_{HA1} cantidad molar nHA1 de hemaglutinina HA1 [µmol]
 n_{AA} cantidad molar de aminoácido individual (resultado del análisis de aminoácidos) [µmol]
 X_{AA} Número de aminoácidos individuales por molécula de hemaglutinina HA1

$$n_{HA1} = n_{HA}$$

n_{HA} cantidad molar de hemaglutinina [µmol]

$$m_{HA} = n_{HA} \cdot m_{HA}$$

n_{HA} cantidad molar de hemaglutinina [µmol]
 m_{HA} masa de HA [µg]
 M_{HA} Masa molecular de hemaglutinina (calculada o determinada) [µg*µmol⁻¹]

$$C_{HA} = m_{HA} * DF / V_i$$

C_{HA} concentración de hemaglutinina [$\mu\text{g}/\text{ml}$]

DF factor de dilución

V_i volumen de inyección [ml]

- 5 En una realización ejemplar de la divulgación, la cuantificación de HA se basa en el área máxima de HA1, que está bien separada de los otros componentes de la vacuna. La aplicabilidad de la presente divulgación se ha demostrado para diferentes subtipos de gripe A, que incluyen, pero sin limitación, H1N1, H3N2, H5N1, H9N2, y gripe B, lo que sugiere que los procedimientos desvelados en el presente documento se pueden aplicar ampliamente para diferentes antígenos de HA. La divulgación se ha descrito en detalle para HA de la gripe, pero no debe limitarse al uso de HA de la gripe solo. La divulgación también es aplicable para los antígenos HA de otros virus y para la separación y cuantificación de otros antígenos o subtipos de antígenos.

- 15 Los procedimientos para determinar la concentración de antígeno en una composición de vacuna descrita en el presente documento miden la concentración de antígeno con una RSD de menos de aproximadamente un 5 %, menos de aproximadamente un 4 %, menos de aproximadamente un 3 %, menos de aproximadamente un 2,9 %, menos de aproximadamente un 2,8 %, menos de aproximadamente un 2,7 %, menos de aproximadamente un 2,6 %, menos de aproximadamente un 2,5 %, menos de aproximadamente un 2,4 %, menos de aproximadamente un 2,3 %, menos de aproximadamente un 2,2 %, menos de aproximadamente un 2,1 %, menos de aproximadamente un 2,0 %, menos de aproximadamente un 1,9 %, menos de aproximadamente un 1,8 %, menos de aproximadamente un 1,7 %, menos de aproximadamente un 1,6 %, menos de aproximadamente un 1,5 %, menos de aproximadamente un 1,4 %, menos de aproximadamente un 1,3 %, menos de aproximadamente un 1,2 %, menos de aproximadamente un 1,1 % y menos de aproximadamente un 1,0 %. En aspectos ejemplares, los procedimientos descritos en el presente documento miden la concentración de antígeno con una RSD de aproximadamente el 2,2 % y aproximadamente el 1,3 %, dependiendo de la concentración de antígeno.

Los Ejemplos que no se encuentran comprendidos en el ámbito de las reivindicaciones son solo a fines ilustrativos.

25 **Ejemplos**

Los aspectos y detalles adicionales de la divulgación serán evidentes a partir de los siguientes ejemplos, que pretenden ser ilustrativos en lugar de limitativos.

Ejemplo 1:

30 **DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DE UN PROCEDIMIENTO PARA EL AISLAMIENTO Y LA CUANTIFICACIÓN DE LA HA EN UNA VACUNA**

El objeto de los experimentos descritos en el presente documento fue desarrollar un nuevo procedimiento de HPLC para medir el contenido total de HA de las preparaciones de vacuna de la gripe A/California/07/2009 (H1N1) basado en la medición de HA (es decir, HA1) cuando no hay reactivos patrón disponibles de la OMS o en otro lugar.

Se evaluaron los siguientes lotes de nuevos productos de la gripe A/California/07/2009 (H1N1):

Tabla 1: Artículos de prueba y referencia

Muestra	Observaciones	Contenido de proteínas ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
1	Lote a pequeña escala	149
2	Lote a gran escala	530
3	Lote a gran escala	373

35

Cuantificación de HA mediante HPLC de fase inversa

- 40 Las condiciones de preparación de la muestra se optimizaron de la siguiente manera. Las muestras sin diluir o las muestras diluidas con agua desionizada se mezclaron con el mismo volumen de tampón reductor (clorhidrato de guanidina 6 M, Tris/HCl 266 mM, EDTA 1mM, pH 8,3 y ditiotreitol 40 mM). Las mezclas se incubaron a 85 °C durante una hora, seguido de la adición de ácido fosfórico al 8,5 % al 10 % (v/v) para detener la reacción y evitar la reacción inversa, la formación de enlaces disulfuro a partir de cisteínas libres. Las muestras se centrifugaron a 18.407 g durante 10 minutos para eliminar cualquier material particulado. Se utilizaron condiciones de HPLC idénticas.

- 45 Se utilizó un sistema de HPLC Agilent equipado con una bomba cuaternaria y un detector de matriz de diodos. Las proteínas se separaron mediante HPLC de fase inversa en una columna Jupiter 5 μ C4 (150 x 2 mm) usando el siguiente gradiente:

Eluyente A: ácido trifluoroacético al 0,1 % en agua

Eluyente B: ácido trifluoroacético al 0,085 % en acetonitrilo

Eluyente C: metanol

- 5 Las muestras y los patrones se inyectaron mediante un procedimiento separado con una elución isocrática de eluyente B al 20 % a una velocidad de flujo de 0,4 ml/min durante 10 minutos. Esto fue seguido por el procedimiento para la elución de las proteínas:

Tabla 2: Gradiente para análisis de HPLC

Tiempo	Eluyente A	Eluyente B	Eluyente C	Caudal
0 min	80 %	20 %	0 %	0,4 ml/min
15 min	58 %	42 %	0 %	
20 min	0 %	100 %	0 %	
21 min	0 %	0 %	100 %	
24 min	0 %	0 %	100 %	
25 min	80 %	20 %	0 %	
40 min	parada			

- 10 Las proteínas eluidas se detectaron utilizando absorción UV a 214 nm. HA1 se cuantificó y se expresó como µg de HA por ml de muestra. Debido a la ausencia de un patrón adecuado, inicialmente solo se informó el área. Esto fue seguido por la cuantificación de HA1 eluido mediante análisis de aminoácidos para la muestra 2. La preparación de muestra de volumen monovalente (MVB, de sus siglas en inglés) (muestra 1) se usó como preparación de referencia para una calibración adicional de los análisis de HPLC.

Análisis de aminoácidos

- 15 La hidrólisis ácida de la proteína se llevó a cabo en ampollas de vidrio. Se añadió 2 nmol de ácido 2-L-amino butírico a cada ampolla como patrón interno y las fracciones de HPLC se recogieron directamente en las ampollas. Las fracciones recogidas se secaron al vacío (SpeedVac, Savant, SVC100H). Las muestras se disolvieron en 300 µl de ácido clorhídrico 6 N/fenol al 0,2 %, se cubrieron con nitrógeno y las ampollas se sellaron por calor. La hidrólisis ácida se llevó a cabo a 115 °C durante 18 h. Se abrieron las ampollas. Se añadieron 500 µl de agua desionizada. La solución se filtró (0,2 µ), se transfirió a viales Eppendorf® y se secó al vacío (SpeedVac, Savant, SVC100H). El análisis de aminoácidos se llevó a cabo utilizando el kit AccQ Tag (Waters, N.º WAT052880) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, las muestras se disolvieron en ácido clorhídrico 0,1 N y los aminoácidos se marcaron utilizando el reactivo de flúor AccQ. El patrón interno (ácido α-amino butírico) y el patrón de aminoácidos (Agilent, N.º 5061-3330) se trataron de la misma manera.

- 25 Se utilizó un sistema de HPLC Waters equipado con una bomba cuaternaria y un detector de fluorescencia (Spectra Systems FL 2000). Los aminoácidos se separaron mediante HPLC de fase inversa en una columna AccQ Tag C18 (4µ, 150 x 3,9 mm, Waters, N.º WAT052885) equipada con una columna Sentry Guard (20 x 3,9 mm, Waters, N.º WAT044380) y precolumna (150 x 2 mm) operado a 37 °C. Se inyectaron 5 µl de muestra y se analizó el perfil de aminoácidos utilizando el siguiente gradiente:

- 30 Eluyente A: Agua desionizada
 Eluyente B: Acetonitrilo, grado de gradiente
 Eluyente C: Concentrado de tampón AccQ-Tag (Waters, N.º WAT052890) diluido 1:10 en agua desionizada

Tabla 3: Gradiente para análisis de aminoácidos

Tiempo	Eluyente A	Eluyente B	Eluyente C	Caudal
0 min	0 %	0 %	100 %	1 ml/min
0,5 min	0 %	1 %	99 %	
18 min	0 %	5 %	95 %	
19 min	0 %	9 %	91 %	
29,5 min	0 %	17 %	83 %	
33 min	40 %	60 %	0 %	
36 min	0 %	0 %	100 %	
60 min	parada			

Los aminoácidos marcados con fluorescencia de elución se detectaron utilizando detección por fluorescencia con excitación a 250 nm y emisión a 394 nm. La calibración se llevó a cabo utilizando un patrón externo (Agilent, N.º 5061-3330) y se corrigió utilizando un patrón interno. Los datos se procesaron adicionalmente para leucina, valina, lisina y fenilalanina, ya que estos son los aminoácidos más estables en condiciones de hidrólisis ácida.

Basado en la secuencia conocida para HA de la gripe A/California/07/2009 (H1N1) (N.º de referencia de GenBank ACQ55359.1), se calculó el número teórico de aminoácidos por molécula de HA1 y, posteriormente, la cantidad molar de HA por inyección. La masa molecular de HA calculada o medida y los factores de dilución aplicados durante la preparación de la muestra permitieron el cálculo de la concentración de HA en la muestra, expresada como µg de HA por ml de muestra.

SDS-PAGE

Las muestras se analizaron mediante electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio y poliacrilamida (SDS-PAGE) seguido de tinción con azul de Coomassie. Las muestras de volumen monovalentes se analizaron en condiciones reductoras y no reductoras y se compararon con HA1 reducida aislada mediante HPLC. Después de la electroforesis, el gel se tiñó durante 2 horas con la solución de Coomassie lista para usar (GelCode® Blue Stain Reagent, Pierce, n.º de cat. 24590). El gel se decoloró con 2-3 cambios de agua desionizada y se mantuvo en agua desionizada durante la noche antes de escanear la imagen. El SDS-gel se escaneó con el programa GelData proporcionado por el fabricante del densitómetro Image Scanner III (GE Healthcare). Se utilizó el software Image Quant TL (Amersham Bioscience) para identificar las bandas y obtener la densidad óptica de la absorción. Los límites de las bandas se establecieron manualmente.

MALDI/TOF

Para los análisis de plazos de desorción/ionización con láser asistido por matriz (MALDI/TOF), las proteínas se purificaron utilizando HPLC mediante el procedimiento descrito anteriormente. La fracción de HPLC liofilizada se disolvió en 5 µl de acetonitrilo al 50 %, ácido fórmico al 0,5 % en agua y se mezcló con solución de matriz (10 mg/ml de ácido sinapínico en acetonitrilo al 50 % y ácido fórmico al 0,5 % en agua). Se depositó 1 µl sobre una diana MALDI/TOF y se secó a temperatura ambiente. Los espectros se adquirieron en un Applied Biosystems 4800 MALDI TOF/TOF utilizando el detector de placas de múltiples canales estándar o un detector de masa alta CovalX HM1.

Los espectros se analizaron utilizando el paquete de software provisto (Data Explorer 4.9, Applied Biosystems). La masa molecular se calculó como una media de al menos 10 espectros adquiridos con calibración externa realizada con albúmina de suero bovino.

Identificación de máximos mediante LC-MS/MS

Los máximos de HPLC se recogieron manualmente y se liofilizaron en un SpeedVac. Los liofilizados se disolvieron en tampón de reconstitución (urea 8M, bicarbonato de amonio 100 mM, pH 8,4), se diluyeron a una concentración final de urea 0,9 M mediante la adición de bicarbonato de amonio 100 mM, pH 8,4 y se digirieron con tripsina.

Para la digestión con tripsina en gel, se hicieron cortes de gel de los geles de SDS-PAGE y se lavaron repetidamente con acetonitrilo seguido de bicarbonato de amonio 100 mM, pH 8,4 y nuevamente acetonitrilo. Como último paso, los cortes de gel se trataron con acetonitrilo y se liofilizaron en un SpeedVac durante 1 h. Los cortes de gel se rehidrataron utilizando una solución de tripsina (12,5 ng/µl) y se digirieron durante la noche. Se recuperaron los péptidos del sobrenadante.

Los péptidos generados se separaron en una HPLC capilar Agilent 1100 usando una columna Zorbax SB300 C18 5µ

150 x 0,5 mm y se analizaron en línea usando cromatografía líquida-espectrometría de masas con huellas dactilares de masa peptídica (LC-MS/MS o MS en tándem) en un espectrómetro de masas cuadrupolo de trampa lineal (LTQ o trampa de iones lineal) Orbitrap equipado con una fuente de electropulverización. Los péptidos se midieron en una exploración precursora en el LTQ Orbitrap con una masa precisa y una resolución de 60.000. Posteriormente, los cuatro iones más intensos se seleccionaron y analizaron utilizando el modo de espectrometría de masas en tándem (MS/MS) en el LTQ. Los espectros de MS/MS se procesaron para la identificación con el software Bioworks 3.3 y se buscaron en una base de datos creada manualmente que contenía proteína del virus solo de H1N1 (secuencias recuperadas de gripe Virus Resource, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/Database/request.cgi>, 15.06.2009) o contra la base de datos Uniprot (Versión 14.8, 10.02.2009). La cuantificación relativa se llevó a cabo utilizando la altura de los máximos en los cromatogramas de iones reconstruidos para los péptidos identificados.

Optimización del procedimiento de HPLC

Los experimentos iniciales con H1N1 se llevaron a cabo utilizando el procedimiento de HPLC establecido para la cuantificación de HA en otras vacunas contra la gripe. Brevemente, la preparación de la muestra incluyó una etapa de desintegración del virus a 37 °C durante 1 h seguido de alquilación con 4-vinilpiridina. Utilizando este procedimiento de preparación de muestras, se aisló HA1 mediante fraccionamiento del máximo de HPLC de la muestra 2 y se cuantificó usando análisis de aminoácidos. Como media de una determinación de seis veces del análisis de aminoácidos, se obtuvo un valor de 62,2 µg/ml de HA en la muestra 1. Se usó SDS-PAGE para estimar la recuperación de HA1 de la muestra. Los geles se tiñeron con Coomassie y se evaluaron mediante exploración densitométrica. Los resultados indicaron que la HA1 aislada que migra a 53 kDa tenía solo aproximadamente el 13 % de la intensidad de la banda correspondiente en la muestra 1. Se utilizaron análisis de LC-MS/MS para determinar la pureza de esta banda en la muestra 1. Estos análisis proporcionaron un contenido de HA1 en esta banda de aproximadamente el 25 % (n = 6), mientras que el contenido principal fue nucleoproteína. En conjunto, los resultados mostraron que la recuperación de HA1 fue solo de aproximadamente el 50 %. Debido a la baja recuperación de HA1, se llevó a cabo una optimización adicional de la preparación de la muestra.

Las temperaturas de incubación durante la etapa de desintegración del virus fueron variadas y se encontraron valores más altos de recuperación para temperaturas a aproximadamente 80 °C. Otros experimentos incluyeron la optimización de la temperatura de incubación para la desintegración del virus entre 37 °C y 90 °C y la optimización de los tiempos de incubación entre 30 min y 4 h. Además, como alternativa para la etapa de alquilación, se investigó la acidificación con ácido fosfórico al 8,5 %.

Se encontró que las condiciones óptimas para la desintegración del virus, es decir, la solubilización, eran aproximadamente 85 °C durante 1 h seguida de la etapa de alquilación o de la etapa de acidificación. Utilizando estas condiciones optimizadas de preparación de la muestra, la recuperación de HA1 se verificó nuevamente mediante SDS-PAGE. Se determinó que la recuperación de HA1 estaba entre el 90 y el 120 % en función del contenido de HA1 en la banda correspondiente en la muestra 1 del 25 %.

Además de la recuperación de HA1, se verificó la especificidad para los dos procedimientos optimizados (con y sin alquilación). Mediante análisis de LC-MS/MS, se determinó que la pureza de la proteína en el máximo de HA1 para el procedimiento con alquilación con 4-vinilpiridina era del 87 %. En cambio, si se utilizó la acidificación con ácido fosfórico en lugar de la alquilación para evitar la reacción inversa de las cisteínas libres, la pureza de la proteína en el máximo de HA1 mejoró al 96 %.

Establecimiento de una preparación de referencia

Alineación de secuencias

Las secuencias con los siguientes números de referencia se recuperaron de Genbank: (1) HA, virus de la gripe A (A/California/07/2009 (H1N1)): ACQ55359.1; y (2) HA, virus de la gripe A (A/Islas Salomón/03/2006(H1N1)), ABU50586.1. Las secuencias de proteínas se alinearon utilizando ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) con la configuración predeterminada.

De acuerdo con la homología de alineamiento de secuencias de HA del virus de la gripe A (A/California/07/2009 (H1N1)) y HA del virus de la gripe A (A/Islas Salomón/03/2006 (H1N1)), la homología de HA es de aproximadamente el 79 % entre estos dos virus. Otras cepas interpandémicas muestran una homología baja comparable con A/California/07/2009 (H1N1). Esta baja homología sugirió que la calibración con un antígeno de referencia interpandémico no era posible en el caso de la cepa pandémica H1N1.

Masa molecular mediante MALDI/TOF

La masa molecular teórica de la HA del virus de la gripe A (A/California/07/2009 (H1N1)) basada en la secuencia de aminoácidos (número de referencia: HA, virus de la gripe A (A/California/07/2009 (H1N1)): ACQ55359.1) es 61424 (HAO, enlaces disulfuro reducidos, comprende HA1 y HA2 que no se escinde proteolíticamente), 36312 para HA1 reducida y 25130 para HA2 reducida. Sin embargo, esto no incluye la modificación posterior a la traducción, como la glicosilación, especialmente la N-glicosilación (se observaron 5 sitios posibles de N-glicosilación en el dominio HA1) que contribuye considerablemente a la masa de la glucoproteína. La masa molecular del HA1 aislado después de la

reducción se midió utilizando MALDI/TOF para que fuera de 45268 ± 119 ($n = 15$), como se midió para la muestra 2. Para la muestra 3, se midió una masa molecular de HA1 de 45229 ± 101 ($n = 20$). Dentro del error del procedimiento, no hubo diferencia en la masa molecular de HA1 entre estos dos lotes. Los datos de MALDI/TOF fueron respaldados por los datos de mapeo de péptidos LC-MS en el que los glucopéptidos se analizaron después de la digestión con tripsina de las proteínas del virus.

5

Tabla 4: Glucopéptidos identificados mediante el mapeo de péptidos LC-MS en HA1 (numeración de aminoácidos excluyendo el péptido señal)

Aminoácido glucosilado	Secuencia de consenso	Isoforma principal	Masa molecular (media)
N10 o N11	NNST	Tipo complejo, triantenario, núcleo fucosilado	2135,0
N23	NVT	Tipo complejo, biantenarico, núcleo fucosilado	1769,6
N87	NGT	Tipo de manosa alta, Man7	1541,4
N278	NTT	Tipo complejo, biantenarico	1623,5
N287	NTS	Tipo complejo, biantenarico	1623,5

Estos resultados de N-glucosilación demostraron una buena concordancia con la diferencia entre la masa molecular medida por MALDI/TOF y la masa molecular teórica. Para el cálculo de masa, se utilizó la masa molecular mediante MALDI/TOF, ya que esta medición se basa en una media de las diferentes isoformas de N-glucosilación.

Tabla 5: Glucopéptidos identificados mediante el mapeo de péptidos LC-MS en HA2 (numeración de aminoácidos excluyendo el péptido señal)

Aminoácido glucosilado	Secuencia de consenso	Isoforma principal	Masa molecular (media)
N462	NGT	Tipo complejo, biantenarico, núcleo fucosilado	1769,6

10

HA2 no se pudo aislar y, por lo tanto, la masa molecular no se pudo medir mediante MALDI/TOF. Sin embargo, la N-glucosilación podría identificarse mediante el mapeo de péptidos LC-MS (Tabla 5). Para el cálculo, se utilizó la masa molecular teórica de HA2 (25130) y se añadió la masa molecular de la N-glucosilación identificada para producir una masa de 26900. De acuerdo con estos valores para HA1 y HA2, la masa molecular total de HA, incluida HA1 glucosilada, HA2 glucosilada y 6 enlaces disulfuro es 72156.

15

Análisis de aminoácidos

El análisis de aminoácidos se llevó a cabo después de la optimización de la preparación de la muestra en paralelo para dos opciones de preparación de la muestra (1) incluyendo una etapa de alquilación con 4-vinilpiridina o (2) incluyendo una etapa de acidificación con ácido fosfórico. La muestra 2 se utilizó como preparación de referencia para la calibración del análisis de HPLC.

20

La muestra 2 se preparó con una etapa de alquilación como se describe a continuación para determinar cómo afectó la alquilación a la purificación. Para determinar el contenido de HA, el fraccionamiento de HA1 se llevó a cabo con una etapa de desintegración a 85°C durante 1 h y alquilación con 4-vinilpiridina. Las fracciones de máximos de HPLC de HA1 se recogieron y se usaron para el análisis de aminoácidos. Los hidrolizados se analizaron por su contenido de leucina, valina, lisina y fenilalanina. El cálculo de la concentración de HA se llevó a cabo utilizando una masa molecular determinada por MALDI/TOF. El contenido medio de HA por máximo fue de $4,6414$ ($n = 8$) correspondiente a $93,7 \pm 3,2$ $\mu\text{g/ml}$ de HA. Debido a que se determinó que la pureza de HA1 era solo del 87 %, el valor de HA se sobreestimó y, por tanto, la alquilación no se consideró útil para un análisis adicional.

25

Tabla 6: Datos de aminoácidos basados en la preparación de muestras de la muestra 2 con desintegración a 85 °C durante 1 h y alquilación con 4-vinilpiridina

	85 °C + 4 VP_2 (mg/máximo)	85 °C + 4 VP_3 (mg/máximo)	85 °C + 4 VP_4 (mg/máximo)	85 °C + 4 VP_5 (mg/máximo)	85 °C + 4 VP_6 (mg/máximo)	85 °C + 4 VP_7 (mg/máximo)
L-Valina	4,47	4,60	4,52	4,71	4,32	4,60
L-Lisina HCL	4,09	4,19	4,23	4,36	3,96	4,17
L-Leucina	4,61	4,73	4,66	4,88	4,42	4,71
L-Fenilalanina	4,92	5,09	4,98	5,25	4,78	5,04
Media	4,52	4,65	4,60	4,80	4,37	4,63
Desviación estándar	0,34	0,37	0,31	0,37	0,34	0,36
% de RSD	7,62	8,00	6,79	7,70	7,72	7,70
El máximo es igual a XXµl MVB	49,50	49,50	49,50	49,50	49,50	49,50
HA (µg/ml) en MVB	91,35	93,94	92,89	96,93	88,27	93,49
HA (µg/ml) en MVB	93,7					
Número	8					
Desviación estándar	3,2					
% de RSD	3,4					

5 La muestra 2 también se preparó con una etapa de acidificación. Para determinar el contenido de HA de la muestra 2, se prepararon fracciones que contenían HA1, incluida una etapa de desintegración a 85 °C durante 1 h y una etapa de acidificación con ácido fosfórico. Las fracciones de máximos de HPLC de HA1 se recogieron y se usaron para el análisis de aminoácidos. Los hidrolizados se analizaron por su contenido de leucina, valina, lisina y fenilalanina. El cálculo de la concentración de HA se llevó a cabo como se describe en el presente documento utilizando la masa molecular determinada mediante MALDI/TOF. El contenido medio de HA por máximo fue de 4,21 µg (n = 8) correspondiente a 92,7 ± 9,0 µg/ml de HA. Este valor se utilizó para una calibración adicional de la determinación de HPLC de HA. El fraccionamiento de HA1 se llevó a cabo para el análisis de aminoácidos.

Tabla 7: Datos de aminoácidos basados en la preparación de muestras con desintegración a 85 °C durante 1h y acidificación usando ácido fosfórico

Nombre de la muestra	85 °C + 4 VP_2 (mg/máximo)	85 °C + 4 VP_3 (mg/máximo)	85 °C + 4 VP_4 (mg/máximo)	85 °C + 4 VP_5 (mg/máximo)	85 °C + 4 VP_6 (mg/máximo)	85 °C + 4 VP_7 (mg/máximo)
L-Valina	4,80	4,33	4,26	4,16	3,90	3,81
L-Lisina HCL	4,45	3,94	3,84	3,79	3,56	3,40
L-Leucina	5,34	4,68	4,46	4,35	4,07	3,93
L-Fenilalanina	5,55	4,91	4,69	4,54	4,22	4,06

10

(continuación)

Nombre de la muestra	85 °C + 4 VP_2 (mg/máximo)	85 °C + 4 VP_3 (mg/máximo)	85 °C + 4 VP_4 (mg/máximo)	85 °C + 4 VP_5 (mg/máximo)	85 °C + 4 VP_6 (mg/máximo)	85 °C + 4 VP_7 (mg/máximo)
Media	5,03	4,47	4,31	4,21	3,94	3,80
Desviación estándar	0,50	0,42	0,36	0,32	0,28	0,29
% de RSD	10,00	9,51	8,40	7,62	7,21	7,54
El máximo es igual a XXµl MVB	45,45	45,45	45,45	45,45	45,45	45,45
HA (µg/m1) en MVB	110,75	98,25	94,92	92,63	86,60	83,62
HA (µg/m1) en MVB	92,7					
Número	8					
Desviación estándar	9,0					
% de RSD	9,7					

Procedimiento final

La Tabla 8 resume los principales parámetros verificados para el desarrollo de un nuevo procedimiento de preparación de muestras. La decisión final sobre qué procedimiento utilizar se basó principalmente en la especificidad utilizando LC-MSMS, en el que el procedimiento que comprende la alquilación con 4-vinil piridina mostró una especificidad considerablemente menor. Esta observación se debió muy probablemente a la posición de elución cambiada, ya que la modificación aumenta ligeramente la hidrofobicidad. La posición de elución cambiada resultó en una diferencia de proteínas coeluyentes. Se llevaron a cabo perfiles de elución HA1 para preparaciones de muestras, con o sin alquilación. Se determinó que el contenido de HA en una muestra preparada con alquilación con 4-vinilpiridina es ligeramente mayor, posiblemente debido a una mayor concentración de proteínas contaminantes.

Tabla 8: Comparación de los principales parámetros de desarrollo del procedimiento para dos preparaciones de muestra.

	Opción 1	Opción 2
Reducción	85 °C, 1 h	85 °C, 1 h
Alquilación	4-vinilpiridina	Sin alquilación, acidificación con ácido fosfórico
Muestra 2 de HA mediante AAA	93,7 µg/m1	92,7 µg/m1
Especificidad mediante SDS-PAGE	Banda única a 53 kDa	Banda única a 53 kDa
Especificidad mediante LC-MSMS	87 %	96 %
Recuperación de HA1 del virus	90-120 %	

Para todos los experimentos siguientes, la preparación de la muestra se llevó a cabo de acuerdo con los procedimientos optimizados descritos en los experimentos iniciales anteriores.

Procedimiento de calificación de linealidad

Uno de los criterios clave de un procedimiento analítico es la linealidad, la capacidad (dentro de un cierto intervalo) para obtener resultados de prueba que son directamente proporcionales a la concentración (cantidad) de analito en la muestra. Para probar la linealidad de la respuesta de HPLC dependiente de la concentración, la muestra 2 se diluyó

a diferentes concentraciones con agua desionizada y se analizaron las muestras a diferentes concentraciones mediante RP-HPLC. La concentración de la preparación de referencia se determinó mediante análisis de aminoácidos como se describe anteriormente.

Tabla 9: Cuantificación de HA con RP HPLC - Linealidad

Nivel	Concentración de proteínas (µg/ml)	Día 1 (área)	Día 2 (área)	Media (área)	% de RSD
1	23,175	1086,10327	1082,69043	1093,21676	1,95
	23,175	1070,05615	1112,24597		
	23,175	1126,27209	1081,93262		
2	30,9	1390,47998	1437,05981	1419,27645	1,52
	30,9	1404,59485	1421,58142		
	30,9	1449,30212	1412,64050		
3	46,35	2089,53711	2053,53540	2097,28626	1,16
	46,35	2113,89282	2097,01416		
	46,35	2108,31055	2121,42749		
4	92,7	4000,14893	4151,25439	4074,06832	1,26
	92,7	4047,75854	4102,61670		
	92,7	4060,75830	4081,87305		
5	139,1	6025,29395	6045,49121	6040,19670	0,51
	139,1	6011,38965	6097,27539		
	139,1	6042,43066	6019,29932		
6	185,4	8058,32422	8064,66162	7986,82243	1,96
	185,4	8001,92432	7980,31494		
	185,4	8130,56104	7685,14844		

Tabla 10: Artículos de prueba y referencia, Muestra 2

Nivel	Dilución	Volumen de inyección (µl)	Concentración de proteínas (µg/ml) determinada mediante AAA
1	1:4	100	23,175
2	1:3	100	30,9
3	1:2	100	46,35
4	No	100	92,7
5	No	150	139,05
6	No	200	185,4

5

Una curva de calibración de los datos mostró una buena linealidad en el intervalo de concentración de proteínas entre 23,175 µg/ml y 185,4 µg/ml. La Tabla 11 muestra los restos calculados. Cada valor calculado individual se encuentra dentro de ± el 5 % del valor teórico.

Tabla 11: Restos de la curva de calibración

Nivel	Concentración de proteínas [µg/ml]	Área medida [mAUx*s]	Concentración de proteínas medida [µg/ml]	Restos [µg/ml]	Restos [%]
1	23,175	1086,10327	22,80	-,038	-1,63
	23,175	1070,05615	22,42	-,075	-3,25
	23,175	1126,27209	23,74	0,57	2,45
	23,175	1082,69043	22,72	-0,46	-1,97
	23,175	1112,24597	23,41	0,24	1,03
	23,175	1081,93262	22,70	-0,47	-2,05
2	30,9	1390,47998	29,96	-0,94	-3,06
	30,9	1404,59485	30,29	-0,61	-1,98
	30,9	1449,30212	31,34	0,44	1,42
	30,9	1437,05981	31,05	0,15	0,49
	30,9	1421,58142	30,69	-0,21	-0,69
	30,9	1412,64050	30,48	-0,42	-1,37
3	46,35	2089,53711	46,39	0,04	0,09
	46,35	2113,89282	46,97	0,62	1,33
	46,35	2108,31055	46,83	0,48	1,04
	46,35	2053,53540	45,55	-0,80	-1,73
	46,35	2097,01416	46,57	0,22	0,47
	46,35	2121,42749	47,14	0,79	1,71
4	92,7	4000,14893	91,32	-1,38	-1,49
	92,7	4047,75854	92,44	-0,26	-0,28
	92,7	4060,75830	92,74	0,04	0,05
	92,7	4151,25439	94,87	2,17	2,34
	92,7	4102,61670	93,73	1,03	1,11
	92,7	4081,87305	93,24	0,54	0,58
5	139,05	6025,29395	138,94	-0,11	-0,08
	139,05	6011,38965	138,61	-0,44	-0,32
	139,05	6042,43066	139,34	0,29	0,21
	139,05	6045,49121	139,41	0,36	0,26
	139,05	6097,27539	140,63	1,58	1,13
	139,05	6019,29932	138,79	-0,26	-0,18
6	185,4	8058,32422	186,74	1,34	0,72
	185,4	8001,92432	185,41	0,01	0,01
	185,4	8130,56104	188,44	3,04	1,64
	185,4	8064,66162	186,89	1,49	0,80
	185,4	7980,31494	184,90	-0,50	-0,27
	185,4	7685,14844	177,96	-7,44	-4,01

Especificidad

Un requisito previo importante para la especificidad es que el máximo de HPLC para HA1 muestre una pureza suficiente. El máximo aislado de HA1 se comprobó mediante SDS-PAGE. Usando SDS-PAGE con tinción de Coomassie, el HA1 aislado migra como una sola banda. Esta banda HA1 se analizó adicionalmente mediante una digestión en gel y análisis LC-MS/MS para la identificación de proteínas en la banda. Esta banda contenía exclusivamente HA1. Una forma más sensible de analizar las proteínas en el máximo de HA1 fue realizar la digestión directamente en la fracción recolectada después de la liofilización.

Para todos los péptidos identificados, se midió la altura del máximo en el cromatograma de iones reconstruido para estimar la pureza de las proteínas contenidas. Como diferentes péptidos tienen diferentes eficacias de ionización, este procedimiento se utilizó como una estimación de qué proteínas eran detectables y una cuantificación relativa aproximada.

Tabla 12: Pureza del máximo 1 y el máximo 2 aislado del máximo doble de HA1

N.º	Referencia	P(pro) ¹	Puntuación ²	Suma de altura de máximos de todos los péptidos identificados	% de altura
1	HA del virus de la gripe A (A/California/07/2009 (H1N1))	1.09E-09	130,15	55264118	96,39
2	Actina de la célula hospedadora relacionada	1.17E-07	56,17	1226697	2,14
3	Cofilin-1 de la célula hospedadora relacionada	2.33E-11	50,20	477875	0,83
4	Proteína de la nucleocápside del virus de la gripe A	9.24E-07	20,14	365744	0,64
Suma				57334434	100,00

¹ P (pro) es la probabilidad de que coincida la proteína (cuanto más bajo sea el valor, mejor será la coincidencia)
² es un parámetro para la calidad de la búsqueda SEQUEST (cuanto más alto sea el valor, mejor será la coincidencia)

Como puede verse en la Tabla 12, el máximo de HA1 contiene > 96 % de HA1. Las impurezas menores se identificaron como nucleoproteínas y proteínas de células hospedadoras (actina y cofilina-1).

15 Precisión

Para mostrar la precisión del procedimiento para determinar el contenido de HA en la muestra 2, se llevaron a cabo un total de 12 determinaciones del contenido de HA en dos días (6 en cada día) a dos concentraciones, 23,175 µg/ml y 92,7 µg/ml. La precisión intradía fue de 2,96 % y 1,77 % para la concentración más baja y de 0,81 % y 0,89 % para las muestras de mayor concentración. La desviación estándar relativa (RSD) fue de 2,19 % para la muestra de menor concentración y de 1,30 % para la muestra de mayor concentración.

Tabla 13: Cuantificación de HA de la muestra 2 diluida 1:4 con agua desionizada, precisión a 23,175 µg/ml

Repetición	Día 1 [µg/ml]	Día 2 [µg/ml]	Todos los datos [µg/ml]
1	22,80	22,72	
2	22,42	23,41	
3	23,74	22,70	
Media	22,99	22,94	22,97
RSD	2,96 %	1,77 %	2,19 %

Tabla 14: Cuantificación de HA de la muestra 2, precisión a 92,7 µg/ml

Repetición	Día 1 [µg/ml]	Día 2][µg/ml]	Todos los datos [µg/ml]
1	91,32	94,87	
2	92,44	93,73	
3	92,74	93,24	
Media	92,17	93,95	93,06
RSD	0,81 %	0,89 %	1,30 %

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para aislar un antígeno de proteína viral de una composición de vacuna que comprende virus, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
- 5 (a) solubilizar el antígeno en la composición de vacuna mediante reducción sin un detergente y sin un agente alquilante, en el que la reducción comprende una temperatura de incubación de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 90 °C;
- (b) acidificación del antígeno para evitar la formación de enlaces disulfuro entre los subtipos de antígenos separados; y
- (c) aislar el antígeno o un subtipo de antígeno mediante fraccionamiento.
- 10 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa de solubilización comprende adicionalmente la desnaturalización con un agente caotrópico.
3. Un procedimiento para cuantificar el antígeno de proteína viral o subtipo de antígeno en una composición de vacuna que comprende virus, comprendiendo el procedimiento el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 con una etapa adicional de cuantificación del antígeno o subtipo de antígeno.
- 15 4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la etapa de cuantificación se lleva a cabo sin utilizar un patrón de antígeno.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que la etapa de cuantificación comprende cuantificar el antígeno mediante análisis de aminoácidos.
- 20 6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la reducción comprende un tiempo de incubación de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 20 horas, de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 2 horas o aproximadamente 1 hora.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 2-6, en el que el agente caotrópico es clorhidrato de guanidina, urea, tiourea, litio, perclorato o tiocianato.
- 25 8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la acidificación se lleva a cabo con ácido fosfórico, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido trifluoroacético, ácido pentafluoropropiónico, ácido heptafluorobutírico o ácido fórmico.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el fraccionamiento se lleva a cabo mediante cromatografía.
10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el antígeno es hemaglutinina (HA).
- 30 11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que la composición de vacuna es una composición de vacuna del virus de la gripe.
12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que el subtipo de antígeno es uno cualquiera de la gripe A HA1, HA2, HA3, HA4, HA5, HA6, HA7, HA8, HA9, HA10, HA11, HA12, HA13, HA14, HA15 y HA16 y la gripe B HA.
- 35 13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 3-12, en el que el procedimiento cuantifica el contenido de antígeno con una desviación estándar relativa (RSD) de menos de aproximadamente el 2,5 %.