

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 734 374**

51 Int. Cl.:

C07K 7/06	(2006.01)
C07K 7/08	(2006.01)
C07K 14/005	(2006.01)
G01N 33/68	(2006.01)
C12Q 1/37	(2006.01)
G01N 33/569	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.02.2014 PCT/US2014/019643**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **04.09.2014 WO14134561**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2014 E 14711887 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019 EP 2961766**

54 Título: **Cuantificación de composiciones de vacuna**

30 Prioridad:

01.03.2013 US 201361771226 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.12.2019

73 Titular/es:

**BOEHRINGER INGELHEIM ANIMAL HEALTH USA
INC. (100.0%)
3239 Satellite Blvd
Duluth, GA 30096, US**

72 Inventor/es:

**EICHMEYER, MARC ALLAN;
ROOF, MICHAEL B.;
SCHAEFFER, MERRILL LYNN;
VAUGHN, ERIC MARTIN;
YANG, KUN;
RUSH, JEREMY RICHARD y
MURFIN, DANIEL JOHN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 734 374 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

Cuantificación de composiciones de vacuna

Antecedentes de la invención

- 5 Para reducir el estrés de los animales y los costes de mano de obra, es deseable vacunar a los animales con la menor cantidad de dosis que sea posible para lograr su efectividad. Se desea una vacuna combinada contra múltiples patógenos que suministre una cantidad efectiva de antígeno contra cada patógeno respectivo. Los médicos y los fabricantes pueden lograr una vacuna combinada mezclando antígenos contra múltiples patógenos respectivos inmediatamente antes de la vacunación, pero tal preparación *in situ* puede introducir errores en la mezcla, y no hay certeza alguna de que las combinaciones de antígenos sean compatibles entre sí.
- 10 Es deseable contar con una vacuna combinada disponible mezclada de antemano contra múltiples patógenos para que se reduzcan los costes de mano de obra y errores potenciales de dosificación y se administre de manera fiable a un sujeto una dosis efectiva de antígeno contra cada patógeno respectivo.
- 15 Para reducir costes de fabricación, es deseable racionalizar la producción de vacunas. Por ejemplo, verificar la calidad de un cultivo celular para el material inmunogénico deseado antes de su recogida o antes de mezclar entre sí múltiples composiciones inmunogénicas puede reducir la variabilidad y el desperdicio.
- 20 Para obtener una autorización de los organismos reguladores para una composición inmunogénica terapéutica —por ejemplo, una vacuna—, así como por razones de seguridad, se requiere un medio de monitorización de la cantidad y la estabilidad del antígeno de la composición. Históricamente, ese método se ha basado en ELISA. El ensayo ELISA requiere la disponibilidad de un anticuerpo adecuado para medir el antígeno. Sin embargo, los métodos basados en ELISA pueden afrontar ciertos obstáculos: (1) no siempre están disponibles los anticuerpos adecuados; y (2) estos métodos no siempre son capaces de cuantificar de forma fiable ni de cuantificar con precisión productos bioterapéuticos complejos. Este obstáculo es especialmente problemático cuando en una vacuna hay presentes múltiples antígenos.
- 25 Sin embargo, para que una vacuna combinada llegue a ser un producto comercial, la estabilidad de referencia de los antígenos combinados debe ser comprobable en la combinación. Es decir, la cantidad de cada antígeno respectivo debe poder determinarse en el transcurso del tiempo después de que se combinen para garantizar que en cada dosis haya presente la cantidad deseada de cada antígeno respectivo.
- 30 En algunas vacunas combinadas, las preparaciones de vacunas individuales pueden contener elementos que interfieren en la detección de los otros componentes de la vacuna usando técnicas típicas. Por ejemplo, una vacuna combinada puede contener antígenos primero y segundo, pudiendo incluir la segunda formulación de antígeno suero procedente de animales que han sido expuestos a un organismo que contiene el primer antígeno, o que han sido vacunados con un antígeno idéntico o antigénicamente similar al primer antígeno. En esta situación, el primer antígeno puede haber provocado la producción de anticuerpos competidores específicos para el primer antígeno; así, el suero presente en la segunda formulación de antígeno puede contener anticuerpos contra el primer antígeno y estos anticuerpos pueden estar presentes en la vacuna combinada. En consecuencia, los medios inmunológicos típicos para monitorizar la estabilidad de referencia del primer antígeno en una vacuna de un solo componente (es decir, ELISA) no podrían determinar adecuadamente la estabilidad de la vacuna combinada resultante. En ausencia de un ensayo ELISA adecuado, la estabilidad del antígeno y la eficacia de la vacuna se determinarían en un estudio clínico en el animal anfitrión. El estudio clínico conllevaría la vacunación de un número estadísticamente relevante de animales seguida por el desafío. Los estudios clínicos son costosos de realizar, incluyendo el coste de los animales, la necesidad de un alojamiento adecuado (biocontención) y el análisis de muestras clínicas recogidas durante el estudio. Se necesitan medios alternativos adecuados para monitorizar la fabricación a gran escala y para determinar de manera fiable las concentraciones finales de los respectivos antígenos en una vacuna combinada.
- 40 En el documento WO 2008/145763 A1, en la página 3, líneas 3-14, se propone un método para cuantificar un polipéptido diana en una muestra que comprende las etapas de:
- 45 (a) proporcionar una muestra que ha de ser analizada;
- (b) añadir a la muestra una cantidad conocida de un homólogo, marcado por isótopo, de dicho polipéptido, generando con ello una muestra marcada;
- 50 (c) tratar la muestra marcada con una actividad proteasa para generar una pluralidad de péptidos proteolíticos;
- (d) analizar por espectrometría de masas (MS) los péptidos proteolíticos generados en la etapa c);
- 55 (e) determinar una razón entre péptido proteolítico marcado por isótopo y el correspondiente péptido proteolítico no marcado; y

- (f) calcular, a partir de la razón y de la cantidad conocida del homólogo marcado por isótopo, la cantidad del polipéptido diana de la muestra.

Williams *et al.* (2008) (*Vaccine* 26(20):2510-20) estudian la cuantificación de hemaglutininas del virus de la gripe en mezclas complejas usando espectrometría de masas en tándem con disolución de isótopos (título de Williams *et al.* (2008)).

Williams *et al.* (2012) (*Vaccine* 30(14):2475-82) describen la cuantificación de la hemaglutinina y la neuraminidasa del virus de la gripe usando espectrometría de masas con disolución de isótopos (título de Williams *et al.* (2012)).

Compendio de la invención

La divulgación proporciona métodos y composiciones —por ejemplo, péptidos específicos que, preferiblemente, están marcados— para ser usadas en dichos métodos para cuantificar la presencia de una o más proteínas diana, preferentemente proteínas virales, en una muestra, preferiblemente de una preparación que contiene agentes que se unen a la proteína diana, usando análisis espectroscópicos de masas de la muestra y, preferentemente, patrones que contienen cantidades conocidas de péptidos firma marcados y no marcados.

La presente invención proporciona:

- [1] Un método de cuantificación de la presencia de una o más proteínas virales en una muestra que comprende:
- a. añadir a la muestra una cantidad conocida de al menos un péptido firma marcado con un isótopo estable específico a al menos una proteína viral;
 - b. digerir la muestra con una proteasa;
 - c. efectuar análisis espectroscópicos de masas de la muestra; y
 - d. determinar la cantidad de proteína viral en la muestra,
- en el que el péptido firma es el siguiente péptido marcado con un isótopo estable:
- NVDHVGLGTAFENSK (SEC ID N° 4)
- o cualquier péptido que tenga una secuencia de aminoácidos que sea al menos un 80% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 4 en toda la longitud de la SEC ID N° 4.
- [2] El método de [1] en el que las una o más proteínas virales son capaces de formar una partícula de tipo viral; y/o en el que la muestra comprende partículas de tipo viral compuestas de una pluralidad de las una o más proteínas virales; y en el que las partículas de tipo viral están compuestas de ORF2 de PCV2a y/o ORF2 de PCV2b.
- [3] El método de [1] o [2] en el que la determinación de la cantidad de proteína viral en la muestra comprende determinar la cantidad de proteína viral en la muestra comparando los resultados del análisis espectroscópico de masas de la muestra, en el que, preferentemente, en el análisis espectroscópico de masas, la señal del péptido firma marcado con un isótopo estable se compara con la señal de uno o más péptidos producida por la digestión de la muestra por la proteasa, en particular con la señal de uno o más péptidos generada por la digestión, por parte de la proteasa, de las una o más proteínas virales de la muestra; y/o en el que los péptidos firma se seleccionan de antemano determinando que son específicos a la digestión por proteasa de la proteína viral que ha de cuantificarse y/o que están específicamente ausentes de la digestión por proteasa de la muestra en ausencia de la proteína viral; y/o que, además, comprende:
- a. determinar la cantidad de proteína viral en la muestra comparando los resultados del análisis espectroscópico de masas de la muestra con una curva patrón de calibración; y/o
 - b. efectuar análisis espectroscópicos de masas de patrones que contienen cantidades conocidas de péptidos firma marcados y/o no marcados; y
 - c. determinar la cantidad de proteína viral en la muestra comparando los resultados del análisis espectroscópico de masas de la muestra con los resultados de los patrones, generándose preferentemente una curva patrón de calibración con los resultados de los patrones, y comparándosela con los resultados del análisis espectroscópico de masas de la muestra;
- y/o en el que la muestra es una muestra de una preparación, y en el que, preferentemente, la preparación es una preparación de una vacuna y/o en el que la muestra es una muestra de preparación de una vacuna, y en el que la preparación contiene opcionalmente agentes que se unen a dicha proteína viral.
- [4] Un método de cuantificación de la presencia de una o más proteínas virales en una muestra de una preparación

que contiene agentes que se unen a dicha proteína viral que comprende:

- a. digerir la muestra con una proteasa;
- 5 b. añadir a la muestra una cantidad conocida de al menos un péptido firma marcado con un isótopo estable específico a al menos una proteína viral, seleccionándose de antemano dichos péptidos firma determinando que:
 - 10 i. dichos péptidos firma son específicos a la digestión por proteasa de la proteína viral que ha de cuantificarse;
 - 15 ii. dichos péptidos firma están específicamente ausentes de la digestión por proteasa de la preparación en ausencia de la proteína viral;
 - 15 iii. dichos péptidos firma producen una intensa señal en un análisis espectrográfico de masas; y
 - 15 iv. dichos péptidos firma producen una señal limpia en un análisis espectrográfico de masas; y
- c. efectuar análisis espectroscópicos de masas de la muestra y de patrones que contienen cantidades conocidas de péptidos firma marcados y no marcados; y
- 20 d. determinar la cantidad de proteína viral en la muestra de preparación de una vacuna comparando los resultados del análisis espectroscópico de masas de la muestra con los resultados de los patrones;

en el que el péptido firma es el siguiente péptido marcado con un isótopo estable:

NVDHVGLGTAFENSK (SEC ID N° 4)

o cualquier péptido que tenga una secuencia de aminoácidos que sea al menos un 80% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 4 en toda la longitud de la SEC ID N° 4.

- 25 [5] El método de uno cualquiera de [1] a [4] en el que la proteína es una proteína de la cápside viral, preferentemente ORF2 de un circovirus porcino (PCV) o VP2 de parvovirus porcino (PPV), y en el que la proteína es opcionalmente ORF2 de PCV2.
- 30 [6] El método de uno cualquiera de [3] a [5] en el que la preparación que contiene agentes que se unen a dicha proteína viral comprende suero porcino y/o suero de otra especie, y en el que los agentes que se unen a dicha proteína viral comprenden, opcionalmente, anticuerpos.
- [7] El método de uno cualquiera de [1] a [6] en el que dicho péptido está marcado, en particular en el resto de aminoácido C-terminal, con al menos un isótopo estable seleccionado entre H², C¹³ y N¹⁵, y/o en el que el péptido firma es:
NVDHVGLGTAFENS[KC¹³N¹⁵] (SEC ID N° 4).
- 35 [8] El método de uno cualquiera de [5] a [7] en el que la proteína es una mezcla de ORF2s de subtipos de PCV2, y en el que los subtipos de PCV2 son opcionalmente PCV2a y PCV2b.
- [9] El método de [8] en el que el ORF2 de PCV2a comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 94% o, preferiblemente, al menos un 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1 o de la SEC ID N° 3 o en el que el ORF2 de PCV2b comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 94% o, preferiblemente, al menos un 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2, y en el que el ORF2 de PCV2b tiene, opcionalmente, la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2.
- 40 [10] El método de uno cualquiera de [2] a [9] en el que, para ORF2 de PCV2a, el péptido firma es:
NVDHVGLGTAFENS[KC¹³N¹⁵] (SEC ID N° 4).
- 45 [11] El método de uno cualquiera de [1] a [10] que, además, comprende, antes de la digestión por proteasa, la inmunopurificación de la proteína viral, y en el que la inmunopurificación, opcionalmente, comprende:
 - a. poner las proteínas virales en contacto con anticuerpos que se unen específicamente a las proteínas virales que corresponden a la secuencia de los péptidos firma, fijándose dichos anticuerpos a un sustrato, y formándose con ello complejos sustrato/anticuerpo-proteína;
 - 50 b. lavar el sustrato con un eluyente que no cause la disociación de los complejos anticuerpo-proteína;
 - c. poner en contacto los complejos anticuerpo-proteína con una proteasa; y

- d. eluir los péptidos generados por la digestión por proteasa con un eluyente que cause la disociación de los complejos anticuerpo-péptido,

en el que los péptidos así obtenidos son usados en etapas subsiguientes; y/o que, además, comprende, antes de la digestión por proteasa, hacer pasar la preparación por una columna cromatográfica de exclusión por tamaño y seleccionar las fracciones eluidas de la columna que contienen proteína viral de fracciones que contienen otros compuestos en la preparación, en función del tamaño molecular; y/o en el se seleccionan las fracciones que contienen partículas de tipo viral (VLP) intactas; y/o que, además, comprende, después de la digestión por proteasa, la inmunopurificación de la digestión de la proteína viral; y/o en el que se usan al menos dos péptidos firma marcados con un isótopo estable, y en el que un primer péptido firma es usado para la cuantificación del péptido viral en la preparación y un segundo péptido firma es usado para la determinación cualitativa de la estabilidad del péptido en la preparación.

- [12] El método de [11] en el que la determinación cualitativa mide si hay presente proteína viral degradada en la muestra.

- [13] El método de [12] en el que la preparación de la vacuna contiene agentes que se unen a una proteína viral de la vacuna viral; y/o que comprende

- a. añadir a la muestra una cantidad conocida de al menos un péptido firma marcado con un isótopo estable específico a al menos una proteína viral;
- b. digerir la muestra con una proteasa;
- c. efectuar análisis espectroscópicos de masas de la muestra; y
- d. determinar la cantidad de proteína viral en la preparación de la vacuna; y/o

en el que la determinación de la cantidad de proteína viral en la preparación de la vacuna comprende determinar la cantidad de proteína viral en la muestra de preparación de una vacuna comparando los resultados del análisis espectroscópico de masas de la muestra, en el que, preferentemente, en el análisis espectroscópico de masas, la señal del péptido firma marcado con un isótopo estable se compara con la señal de uno o más péptidos producida por la digestión de la muestra por la proteasa, en particular con la señal de uno o más péptidos producida por la digestión por proteasa de las una o más proteínas virales de la muestra; y/o en el que los péptidos firma se seleccionan de antemano determinando que son específicos a la digestión por proteasa de la proteína viral que ha de cuantificarse y/o que están específicamente ausentes de la digestión por proteasa de la preparación en ausencia de la proteína viral.

- [14] El método de [12] o [13] que, además, comprende:

- a. determinar la cantidad de proteína viral en la muestra de preparación de una vacuna comparando los resultados del análisis espectroscópico de masas de la muestra con una curva patrón de calibración; y/o
- b. efectuar análisis espectroscópicos de masas de patrones que contienen cantidades conocidas de péptidos firma marcados y/o no marcados; y
- c. determinar la cantidad de proteína viral en la muestra de preparación de una vacuna comparando los resultados del análisis espectroscópico de masas de la muestra con los resultados de los patrones, generándose preferentemente una curva patrón de calibración con los resultados de los patrones, y comparándosela con los resultados del análisis espectroscópico de masas de la muestra.

- [15] El método de uno cualquiera de [3] a [11] o de uno cualquiera de [13] o [14] en el que los agentes que se unen a dicha proteína viral son anticuerpos que, preferiblemente, se unen a dichas una o más proteínas virales con una afinidad constante de 10^5 mol^{-1} to 10^{12} mol^{-1} .

- [16] El método de uno cualquiera de [12] a [15] en el que la MRM-MS comprende:

- a. digerir una muestra de la preparación de la vacuna con una proteasa;
- b. añadir a la muestra una cantidad conocida de al menos un péptido firma marcado con un isótopo estable específico a al menos una proteína viral, seleccionándose de antemano dichos péptidos firma determinando que:
 - i. dichos péptidos firma son específicos a la digestión por proteasa de la proteína viral que ha de cuantificarse;
 - ii. dichos péptidos firma están específicamente ausentes de la digestión por proteasa de la preparación en ausencia de la proteína viral;

- iii. dichos péptidos firma producen una intensa señal en un análisis espectrográfico de masas; y
 - iv. dichos péptidos firma producen una señal limpia en un análisis espectrográfico de masas; y
- 5 c. efectuar análisis espectroscópicos de masas de la muestra y de patrones que contienen cantidades conocidas de péptidos firma marcados y no marcados; y
- d. determinar la cantidad de proteína viral en la muestra de preparación de una vacuna comparando los resultados del análisis espectroscópico de masas de la muestra con los resultados de los patrones.
- 10 [17] El método de uno cualquiera de [1] a [16] en el que la realización de los análisis espectroscópicos de masas comprende:
- a. ionizar la muestra;
 - 15 b. separar una pluralidad de iones según su masa o sus razones de masa a carga; y
 - c. detectar al menos un ion correspondiente a la proteína viral, y
- en el que la separación incluye opcionalmente la clasificación de la pluralidad de iones por masa.
- [18] El método de [17] que, además, comprende generar una señal para la detección representativa de una masa para el al menos un ion de la proteína viral, y que, opcionalmente, comprende, además, procesar un espectro para la masa del al menos un ion de la proteína viral a partir de la señal.
- 20 [19] El método de uno cualquiera de [17] o [18] que, además, comprende generar un espectro de masa de la pluralidad de iones para la muestra según las razones de masa a carga; y/o que, además, comprende seleccionar un dispositivo de espectrometría de masas para detectar el al menos un ion; y/o que, además, comprende detectar un segundo ion correspondiente a otra proteína viral dentro de la muestra; y/o que, además, comprende usar un espectrómetro de masas de triple cuadrípulo para efectuar los análisis.
- 25 [20] El método de uno cualquiera de [1] a [19] en el que la realización de análisis espectroscópicos de masas comprende:
- a. seleccionar un ion de interés relacionado con el péptido firma;
 - 30 b. filtrar una pluralidad de iones generados por una ionización de partículas dentro de la muestra; y
 - c. analizar iones fragmento correspondientes al ion de interés; y/o
- en el que la realización de los análisis espectroscópicos de masas comprende:
- 35 a. ionizar la muestra;
 - b. separar una pluralidad de iones según sus razones de masa a carga; y
 - c. detectar al menos un ion correspondiente a la proteína viral, y/o
- 40 en el que la proteasa se selecciona del grupo constituido por tripsina, quimotripsina, pepsina, trombina, papaína, bromelina, termolisina, subtilisina, factor Xa, proteasa de *Staphylococcus aureus*, carboxipeptidasa A, y combinaciones de los mismos.
- [21] El método de uno cualquiera de [1] a [12] o [17] a [20] en el que la muestra es una muestra de material de origen animal o una muestra de una preparación de material de origen animal, en el que el material de origen animal se selecciona preferentemente de fluido y tejido corporal, y en el que el material de origen animal se selecciona, preferiblemente, entre sangre, suero sanguíneo, plasma sanguíneo, orina, calostro, secciones tisulares y biopsias tisulares.
- 45 [22] Un método of diagnosis o monitorización de una infección viral que comprende el método de [21], y en el que la infección viral es, opcionalmente, una infección con PCV2, en particular una infección con PCV2a y/o PCV2b, y/o en el que el animal es, opcionalmente, un cerdo.
- 50 [23] Un péptido aislado marcado por masa que es el siguiente péptido marcado por isótopo estable:
- NVDHVGLGTAFENSK (SEC ID N° 4), en el que dicho péptido está preferiblemente marcado, en particular en el resto de aminoácido C-terminal, con al menos un isótopo estable seleccionado entre H², C¹³ y N¹⁵.

[24] Un péptido aislado marcado por masa que es:

NVDHVGLGTAFENS[KC¹³N¹⁵] (SEC ID N° 4).

En un aspecto preferido, la divulgación proporciona un método de cuantificación de la presencia de una o más proteínas virales en una muestra de una preparación que contiene agentes que se unen a la proteína viral que comprende

- (a) digerir la muestra con una proteasa;
- (b) añadir a la muestra una cantidad conocida de al menos un péptido firma marcado con un isótopo estable específico a al menos una proteína viral, en el que los péptidos firma son seleccionados de antemano determinando que
 - i. los péptidos firma son específicos a la digestión por proteasa de la proteína viral que ha de cuantificarse;
 - ii. los péptidos firma están específicamente ausentes de la digestión por proteasa de la preparación en ausencia de la proteína viral;
 - iii. los péptidos firma producen una intensa señal en el análisis espectrográfico de masas; y
 - iv. los péptidos firma producen una señal distinguible en un análisis espectrográfico de masas;
- (c) efectuar análisis espectroscópicos de masas de la muestra y de patrones que contienen cantidades conocidas de péptidos firma marcados y no marcados; y
- (d) determinar la cantidad de proteína viral en la muestra de preparación de una vacuna comparando los resultados del análisis espectroscópico de masas de la muestra con los resultados de los patrones.

En una realización preferida, la proteína es ORF2 de un circovirus porcino (PCV).

En una realización preferida adicional, la proteína es ORF2 de PCV2 y el péptido firma es

NVDHVGLGTAFENS[KC¹³N¹⁵] (SEC ID N° 4).

En otra realización, la proteína es una mezcla de ORF2 de subtipos de PCV2; por ejemplo, PCV2a y PCV2b.

En otras realizaciones adicionales preferidas, el método comprende, además, después de la digestión por proteasa, la inmunopurificación de la digestión de la proteína viral, o hacer pasar la preparación por una columna cromatográfica de exclusión por tamaño y seleccionar las fracciones eluidas de la columna que contienen proteína viral de fracciones que contienen otros compuestos en la preparación, en función del tamaño molecular.

En otra realización adicional, se usan al menos dos péptidos firma marcados con un isótopo estable, usándose un primer péptido firma para la cuantificación del péptido viral en la preparación y usándose un segundo péptido firma para la determinación cualitativa de la estabilidad del péptido en la preparación.

Otra realización es un método de creación de una preparación de vacuna o una preparación inmunogénica que contiene uno o más inmunógenos virales, conteniendo la vacuna o la preparación inmunogénica agentes que se unen a una proteína viral en una primera composición inmunogénica, que comprende el uso de monitorización de reacción múltiple-espectrometría de masas (MRM-MS) para ensayos cuantitativos y cualitativos para una o más preparaciones o determinaciones de control de calidad. Las composiciones inmunogénicas pueden comprender antígenos virales y/o antígenos bacterianos.

Otra realización preferida adicional comprende métodos descritos más arriba en los que la MRM-MS comprende

- a. digerir una muestra de la vacuna o de la preparación inmunogénica con una proteasa;
- b. añadir a la muestra una cantidad conocida de al menos un péptido firma marcado con un isótopo estable específico a al menos una proteína viral, seleccionándose de antemano los péptidos firma determinando que
 - i. los péptidos firma son específicos a la digestión por proteasa de la proteína viral que ha de cuantificarse;
 - ii. los péptidos firma están específicamente ausentes de la digestión por proteasa de la preparación en ausencia de la proteína viral;
 - iii. los péptidos firma producen una intensa señal en un análisis espectrográfico de masas; y
 - iv. los péptidos firma producen una señal distinguible en un análisis espectrográfico de masas;

- c. efectuar análisis espectroscópicos de masas de la muestra y de patrones que contienen cantidades conocidas de péptidos firma marcados y no marcados; y
- d. determinar la cantidad de proteína viral en la muestra de preparación de una vacuna comparando los resultados del análisis espectroscópico de masas de la muestra con los resultados de los patrones.

Otra realización preferida comprende métodos descritos más arriba en los que la realización de los análisis espectroscópicos de masas comprende:

- a. ionizar la muestra;
- b. separar una pluralidad de iones según su masa o sus razones de masa a carga; y
- c. detectar al menos un ion correspondiente a la proteína viral.

En un aspecto particularmente preferido, la divulgación proporciona un péptido aislado marcado por masa seleccionado del grupo constituido por:

- a. NVDHVGLGTAFENS[$K^{13}N^{15}$] (SEC ID N° 4),
- b. VEFWPCSPITQGD[$R^{13}N^{15}$] (SEC ID N° 24),
- c. SVPFEYY[$R^{13}N^{15}$] (SEC ID N° 27),
- d. HTITQPFSYHS[$R^{13}N^{15}$] (SEC ID N° 15),
- e. TFGYTV[$K^{13}N^{15}$] (SEC ID N° 5),
- f. ATTVTTPSWAVDMM[$R^{13}N^{15}$] (SEC ID N° 6),
- g. FNIDDFVPPGGGTNKISIPFEYY[$R^{13}N^{15}$] (SEC ID N° 7),
- h. ATALTYDPYVNYSS[$R^{13}N^{15}$] (SEC ID N° 8),
- i. HTIPQPFSYHSR (SEC ID N° 9),
- j. YFTP KPVL DSTIDYFQPNN[$K^{13}N^{15}$] (SEC ID N° 10),
- k. VTMYVQF[$R^{13}N^{15}$] (SEC ID N° 11),
- l. MTTVTTPSWNV DMM[$R^{13}N^{15}$] (SEC ID N° 12),
- m. FNINDFLPPGGGSNPLTVPFEYY[$R^{13}N^{15}$] (SEC ID N° 13),
- n. ANALTYDPYVNYSS[$R^{13}N^{15}$] (SEC ID N° 14),
- o. YFTP[$K^{13}N^{15}$] (SEC ID N° 16),
- p. PVLD[$R^{13}N^{15}$] (SEC ID N° 17),
- q. LQTTGNVDHVGLGTAFENSIYDQDYNI[$R^{13}N^{15}$] (SEC ID N° 18),
- r. ITMYVQF[$R^{13}N^{15}$] (SEC ID N° 19),
- s. EFNL[$K^{13}N^{15}$] (SEC ID N° 20),
- t. DPPLNP[$K^{13}N^{15}$] (SEC ID N° 21),
- u. YFTP KPVL D[$R^{13}N^{15}$] (SEC ID N° 22),
- v. EFNLKDPPLNP[$K^{13}N^{15}$] (SEC ID N° 23),
- w. VEFWPCSPITQGD[$R^{13}N^{15}$] (SEC ID N° 24),
- x. GVGSTAVILDDNFVT[$K^{13}N^{15}$] (SEC ID N° 25), y combinaciones de los mismos.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Cromatograma de masas de transiciones extraídas de péptidos de un conjunto de datos de curvas patrón. (a) Transiciones del péptido NVDHVGLGTAFENSK (SEC ID N° 4). Las áreas de los picos para la transición 794,4/1023,5 están integradas (rayadas). Las otras tres trazas son para las transiciones 794,4/853,4 (rosa), 798,4/1031,5 (naranja), 798,4/861,4 (verde); (b) transiciones del péptido VEFWPCSPITQGDR (SEC ID N° 24). Las áreas de los picos para la transición 846,9/1131,5 están integradas (rayadas). Las otras tres trazas son para las transiciones 846,9/786,4 (rosa), 851,9/1141,5 (naranja), 851,9/796,5 (verde).

Figura 2: Curvas patrón para ORF2. En el eje x se representaron concentraciones de ORF2 marcado. En el eje y se representaron las razones en las áreas de los picos entre el péptido ORF2 y el péptido AQUA. (a) Curvas patrón para el péptido NVDHVGLGTAFENSK (SEC ID N° 4), que incluyen tanto la transición 1 (T1) como la transición 2 (T2); (b) curva patrón para el péptido VEFWPCSPITQGDR (SEC ID N° 24), que incluye tanto la transición 1 (T1) como la transición 2 (T2).

Figura 3: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los ORF2 de PCV2a y PCV2b. Los péptidos firma para las secuencias están indicados como sigue:

- Recuadro naranja: Péptido común tanto para PCV2a como para 2b: VEFWPCSPITQGDR (SEC ID N° 24)
- Recuadro rosa: Péptido específico a PCV2a: ISIPFEYYR (SEC ID N° 26)
- Recuadro azul: Péptido específico a PCV2a: NVDHVGLGTAFENSK (SEC ID N° 4)
- Recuadro verde: Péptido específico a PCV2b: SVPFEYYR (SEC ID N° 27)
- Recuadro morado: Péptido específico a PCV2b: HTITQPFSYHSR (SEC ID N° 15)

Descripción detallada de la invención

La invención se basa en el hallazgo sorprendente de que los análisis espectroscópicos de masas, en particular usando monitorización de reacción múltiple-espectrometría de masas (MRM-MS), son adecuados para cuantificar de manera suficiente la cantidad de proteínas virales, en particular de partículas de tipo viral (VLP), como las VLP compuestas de dos proteínas virales diferentes, particularmente también en una muestra que incluye anticuerpos que se unen a dichas proteínas virales y a dichas VLP.

Por ende, la invención está dirigida a un método de cuantificación de la presencia de una o más proteínas (naturales o recombinantes) procedentes de un agente infeccioso, como un virus, una bacteria, un micoplasma, un prion, o un parásito, en una muestra, que comprende

- (a) añadir a la muestra una cantidad conocida de al menos un péptido firma marcado con un isótopo estable específico a al menos una proteína del agente infeccioso;
- (b) digerir la muestra con una proteasa;
- (c) efectuar análisis espectroscópicos de masas de la muestra; y
- (d) determinar la cantidad de proteína del agente infeccioso en la muestra.

Así, en un aspecto, la invención está relacionada con un método de cuantificación de la presencia de una o más proteínas virales en una muestra que comprende:

- (a) digerir la muestra con una proteasa;
- (b) añadir a la muestra una cantidad conocida de al menos un péptido firma marcado con un isótopo estable específico a al menos una proteína viral;
- (c) efectuar análisis espectroscópicos de masas de la muestra, preferentemente usando monitorización de reacción múltiple-espectrometría de masas (MRM-MS); y
- (d) determinar la cantidad de proteína viral en la muestra.

Dicha muestra es, en particular, una muestra de una preparación en la que, preferentemente, la preparación es una preparación de una vacuna. Más preferentemente, dicha muestra es una muestra de una preparación de una vacuna.

En una realización preferida particular, la preparación descrita en la presente memoria contiene agentes que se unen a las una o más proteínas virales, siendo los agentes, preferentemente, anticuerpos.

En el contexto de la presente invención, se entiende en particular que la expresión “espectroscópico de masas” es equivalente a la expresión “espectrométrico de masas”.

5 Según un aspecto preferido de la invención, las una o más proteínas virales son capaces de formar una partícula de tipo viral y/o la muestra comprende partículas de tipo viral compuestas de una pluralidad de las una o más proteínas virales, estando dichas partículas de tipo viral compuestas preferiblemente de ORF2 de PCV2a y/o ORF2 de PCV2b.

10 La determinación de la cantidad de proteína viral en la muestra in particular comprende o consiste en determinar la cantidad de proteína viral en la muestra comparando los resultados del análisis espectroscópico de masas de la muestra, comparándose preferentemente, en el análisis espectroscópico de masas, la señal del péptido firma marcado con un isótopo estable con la señal de uno o más péptidos producida por la digestión de la muestra por la proteasa, en particular con la señal de uno o más péptidos generada por la digestión, por parte de la proteasa, de las una o más proteínas virales de la muestra.

Preferentemente, los péptidos firma se seleccionan de antemano determinando que son específicos a la digestión por proteasa de la proteína viral que ha de cuantificarse y/o que están específicamente ausentes de la digestión por proteasa de la muestra en ausencia de la proteína viral.

15 Según otro aspecto preferido, el método de cuantificación de la presencia de una o más proteínas virales en una muestra de la presente invención comprende, además, determinar la cantidad de proteína viral en la muestra comparando los resultados del análisis espectroscópico de masas de la muestra con una curva patrón de calibración; y/o efectuar análisis espectroscópicos de masas de patrones que contienen cantidades conocidas de péptidos firma marcados y/o no marcados; y determinar la cantidad de proteína viral en la muestra comparando los resultados del análisis espectroscópico de masas de la muestra con los resultados de los patrones, generándose preferentemente una curva patrón de calibración con los resultados de los patrones, y comparándose con los resultados del análisis espectroscópico de masas de la muestra.

20

25 En otro aspecto, la invención también está relacionada con un método de creación de una preparación para una vacuna que contiene una o más vacunas virales, que comprende el uso de monitorización de reacción múltiple-espectrometría de masas (MRM-MS) para ensayos cuantitativos y/o cualitativos para una o más determinaciones de control de la preparación o de la calidad.

Preferentemente, la preparación de la vacuna contiene agentes, preferentemente anticuerpos, que se unen a una proteína viral en la vacuna viral.

30 La constante de afinidad para la unión de los agentes a la proteína viral, descrita en la presente memoria, está preferiblemente en el intervalo de 10^5 mol^{-1} a 10^{12} mol^{-1} o por encima.

En un aspecto preferido, el método de creación de una preparación de vacuna de la presente invención comprende, preferentemente, las etapas de:

- 35 (a) añadir a la muestra una cantidad conocida de al menos un péptido firma marcado con un isótopo estable específico a al menos una proteína viral;
- (b) digerir la muestra con una proteasa;
- (c) efectuar análisis espectroscópicos de masas de la muestra; y
- 40 (d) determinar la cantidad de proteína viral en la preparación de la vacuna.

Preferentemente, la determinación de la cantidad de proteína viral en la preparación de la vacuna comprende o consiste en determinar la cantidad de proteína viral en la muestra de preparación de una vacuna comparando los resultados del análisis espectroscópico de masas de la muestra, comparándose preferentemente, en el análisis espectroscópico de masas, la señal del péptido firma marcado con un isótopo estable con la señal de uno o más péptidos producida por la digestión de la muestra por la proteasa, in particular con la señal de uno o más péptidos producida por la digestión por proteasa de las una o más proteínas virales de la muestra.

45

En otro aspecto preferido del método de creación de una preparación de vacuna de la presente invención, los péptidos firma se seleccionan de antemano determinando que son específicos a la digestión por proteasa de la proteína viral que ha de cuantificarse y/o que están específicamente ausentes de la digestión por proteasa de la preparación en ausencia de la proteína viral.

50

Según un aspecto preferido particular, el método de creación de una preparación de vacuna de la presente invención comprende, además, determinar la cantidad de proteína viral en la muestra de preparación de una vacuna comparando los resultados del análisis espectroscópico de masas de la muestra con una curva patrón de calibración; y/o efectuar análisis espectroscópicos de masas de patrones que contienen cantidades conocidas de péptidos firma marcados y/o no marcados; y determinar la cantidad de proteína viral en la muestra de preparación de una vacuna comparando los resultados del análisis espectroscópico de masas de la muestra con los resultados de los patrones, generándose

55

preferentemente una curva patrón de calibración con los resultados de los patrones, y comparándosela con los resultados del análisis espectroscópico de masas de la muestra.

Según un aspecto preferido particular, las una o más proteínas virales, descritas en la presente memoria, son una o más proteínas de la cápside viral, preferentemente ORF2 de un circovirus porcino (PCV) o VP2 de parvovirus porcino (PPV).

Preferentemente, los péptidos firma descritos en la presente memoria son uno o más de los siguientes péptidos marcados por isótopo estable:

NVDHVGLGTAFENSK (SEC ID N° 4),

TFGYTVK (SEC ID N° 5)

ATTVTTPSWAVDMMR (SEC ID N° 6)

FNIDDFVPPGGGTNKISIPFEYR (SEC ID N° 7)

ATALTYDPYVNYSSR (SEC ID N° 8)

HTIPQPFSYHSR (SEC ID N° 9)

YFTPKPVLDSTIDYFQPNNK (SEC ID N° 10)

VTMYVQFR (SEC ID N° 11)

MTTVTTPSWNVDMMR (SEC ID N° 12),

FNINDFLPPGGGSNPLTVPFEYR (SEC ID N° 13),

ANALTYDPYVNYSSR (SEC ID N° 14),

HTITQPFSYHSR (SEC ID N° 15),

YFTPK (SEC ID N° 16),

PVLDR (SEC ID N° 17),

LQTTGNVDHVGLGTAFENSIYDQDYNIR (SEC ID N° 18),

ITMYVQFR (SEC ID N° 19),

EFNLK (SEC ID N° 20),

DPPLNPK (SEC ID N° 21),

YFTPK PVLDR (SEC ID N° 22),

EFNLK DPPLNPK (SEC ID N° 23),

VEFWPCSPITQGDR (SEC ID N° 24),

GVGSTAVILDDNFVTK (SEC ID N° 25),

y cualquier péptido que tenga una secuencia de aminoácidos que sea al menos un 80% idéntica a la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N°s 4 a 25, estando dichos péptidos preferentemente marcados, en particular en el resto de aminoácido C-terminal, con al menos un isótopo estable seleccionado entre H², C¹³ y N¹⁵.

Según se usa en la presente memoria, se entiende en particular que la expresión "idéntica a la secuencia de la SEC ID N° X" es equivalente a la expresión "idéntica a la secuencia de la SEC ID N° X en la longitud de la SEC ID N° X" o a la expresión "idéntica a la secuencia de la SEC ID N° X en toda la longitud de la SEC ID N° X", respectivamente. En este contexto, "X" es cualquier número entero seleccionado entre 1 y 28, por lo que "SEC ID N° X" representa cualquiera de las SEC ID N°s mencionadas en la presente memoria.

La proteasa descrita en el contexto de la presente invención es seleccionada preferentemente del grupo constituido por tripsina, quimotripsina, pepsina, trombina, papaína, bromelina, termolisina, subtilisina, factor Xa, proteasa de

Staphylococcus aureus, carboxipeptidasa A, y combinaciones de los mismos.

Además, según un aspecto adicional de la presente invención, el método de cuantificación de la presencia de una o más proteínas virales en una muestra de la presente invención es usado para el diagnóstico o la monitorización de una infección viral, siendo la infección viral, en particular, una infección con PCV2, más en particular una infección con PCV2a y/o PCV2b, y/o en la que el animal es un cerdo.

Preferentemente, la muestra es, en particular, una muestra de material de origen animal o una muestra de una preparación de material de origen animal, en la que el material de origen animal se selecciona preferentemente de fluido y tejido corporal.

Dicho material de origen animal se selecciona, preferiblemente, entre sangre, suero sanguíneo, plasma sanguíneo, orina, calostro, secciones tisulares y biopsias tisulares.

Preferentemente, la invención proporciona métodos y composiciones mejorados para la determinación cuantitativa de un componente, preferiblemente un antígeno, en una vacuna, preferiblemente una vacuna combinada, en particular en la que otro componente de la vacuna interfiere en los inmunoensayos típicos. En particular, la invención versa sobre la determinación cuantitativa de un primer antígeno de vacuna en una vacuna combinada con una segunda vacuna, segunda vacuna que incluye un componente biológico —por ejemplo, suero— que interfiere en el inmunoensayo típico. Por ejemplo, el suero puede derivarse de animales que han sido expuestos al primer antígeno, por lo que el suero contiene anticuerpos que interfieren en un ensayo ELISA para el primer antígeno. Por ejemplo, tanto el *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyo.*) como el circovirus porcino 2 (PCV2) son patógenos del cerdo, y es deseable vacunar contra ambos patógenos. El caldo usado para cultivar *M. hyo.* incluye suero porcino. Dado que la mayor parte de los cerdos son inmunizados contra el PCV2, el caldo usado para cultivar *M. hyo.* incluye cantidades variables de anticuerpos anti-PCV2. Estos anticuerpos anti-PCV2 pueden interferir en un inmunoensayo típico que se usa ya sea para cuantificar o monitorizar la estabilidad de una vacuna combinada que incluye cantidades terapéuticas tanto de antígeno de PCV2 como de antígeno de *M. hyo.* después de que los antígenos se combinen entre sí.

Monitorización de reacción múltiple-espectrometría de masas

La monitorización de reacción múltiple-espectrometría de masas (MRM-MS, o, según se usa en la presente memoria, MRM), combinada con un patrón interno macado por un isótopo estable, se usa en la industria farmacéutica para la detección cuantitativa de moléculas pequeñas. La MRM-MS es teóricamente útil cuando no hay disponible ningún par adecuado de anticuerpos específicos. La MRM-MS también es teóricamente adecuada cuando se precisa un panel múltiple o la proteína candidata es una proteína modificada, y puede medir proteína en concentraciones altas o bajas procedentes de fuentes diversas, incluyendo suero y tejido. La MRM-MS también puede medir múltiples proteínas diana simultáneamente en un ensayo. Opcionalmente, como patrones internos se usan comúnmente péptidos marcados con isótopos pesados estables. Así, a pesar de las incertidumbres implicadas en la identificación y la creación de péptidos de referencia adecuados, la MRM-MS tiene el potencial de ser usada en ensayos de potencia para vacunas durante la fabricación y después del procesamiento final, para que sea útil para verificar la estabilidad de la vacuna, para verificar la estabilidad de referencia (es decir, demostración de la estabilidad), y para la identificación de nuevos biomarcadores de enfermedades. A pesar de las incertidumbres inherentes en la tecnología, en ciertas aplicaciones la MRM-MS podría ser usada teóricamente para abordar ciertos problemas presentados en la detección por ELISA. El siguiente cuadro resume en general una comparación de las dos técnicas.

Comparación de los métodos ELISA y MRM-MS para la cuantificación de un producto bioterapéutico

ELISA	MRM-MS
Requiere pares de anticuerpos específicos	Ensayo no basado en anticuerpos
CV <20%	CV<10%
El anticuerpo puede tener reactividad cruzada	Específica a la secuencia de proteínas
Sensibilidad: ng/mL	Igual
Matriz: suero o plasma	Igual
Solo una proteína puede ser medida por ensayo	1-50 proteínas diana pueden ser medidas simultáneamente en un solo análisis
Tiempo de ejecución del ensayo ELISA: 4~8 horas	Comparable

Quando se desarrolló inicialmente la MRM, no era práctica para la cuantificación de proteínas en muestras biológicas complejas, porque los ensayos de MRM necesitan proteínas definidas para los ensayos de potencia y la monitorización de la estabilidad de referencia. Este problema se ha superado en algunos casos específicos, en los que se ha demostrado que la MRM cuantifica simultánea y absolutamente los antígenos de la hemagglutinina (HA) de tres tipos de gripe en vacunas comerciales. Véase Williams *et al.* 2008, Quantification of influenza virus hemagglutinins in complex mixtures using isotope dilution tandem mass spectrometry. *Vaccines* 26: 2510-2520. Williams *et al.* demostraron que se cuantificaba que las cantidades totales de HA de H1, H3 y B eran 24, 16 y 38 microgramos por

0,5 ml usando métodos de MRM en vacunas comerciales. Sin embargo, la vacuna contra la gripe está compuesta por un antígeno parcialmente purificado, no contiene ningún adyuvante, y la hemaglutinina no está suspendida en una matriz compleja. Así, aunque la MRM puede ser capaz de cuantificar componentes específicos de productos bioterapéuticos sumamente complejos si pueden identificarse dianas adecuadas, muchas dianas son inadecuadas para la detección por MRM debido a diversas interacciones moleculares; por ejemplo, las que contienen ciertos adyuvantes, y aquellas en las que el antígeno se encuentra en una matriz compleja de anticuerpos antagónicos y/o un medio proteináceo que podría afectar a la cuantificación.

Hay muchas aplicaciones en la producción de vacunas y el análisis de control de la calidad para las cuales la MRM puede ser útil, en particular en las que no es posible en ensayo ELISA típico, según se ha expuesto anteriormente. En particular, no puede usarse ELISA cuando se encuentran otras componentes de la mezcla compleja de las vacunas y otros componentes, incluyendo, por ejemplo, vacunas polivalentes en las que múltiples componentes tienen propiedades antigénicas similares, o vacunas que incluyen suero procedente de animales que tienen anticuerpos interferentes como resultado de una infección o una vacunación previa. En estos casos, pueden identificarse péptidos específicos que pueden ser usados como “péptidos firma” para detectar y cuantificar la cantidad y la naturaleza —por ejemplo, intacta o degradada— de antígeno en la mezcla.

Por ejemplo, el circovirus porcino de tipo 2 (PCV2) ha sido identificado como el agente causante del síndrome multisistémico de adelgazamiento porcino (PMWS). El marco abierto de lectura número 2 (ORF2) codifica una proteína de nucleocápside que se ha documentado que es inmunogénica. El ORF2 ha sido clonado en un sistema de expresión de baculovirus y es capaz de ser expresado cuando es cultivado en un cultivo en células de insecto. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n^{os} 7.910.306; 7.914.992; y 8.025.888. La proteína purificada de ORF2 o el ORF2 preparado en una matriz de vacuna monovalente puede ser sometido a ensayo directamente por MRM; sin embargo, aún más en particular, cuando está presente, el antígeno de la proteína de ORF2 es un componente de una formulación de vacuna bivalente, consistiendo el otro componente en otro antígeno, tal como *Mycoplasma hyopneumoniae*, que es producido en un caldo que contiene suero porcino. Así, una vacuna combinada contiene en la matriz de la vacuna cantidades variables de anticuerpos de IgG endógena de suero porcino (PAb), que, naturalmente, compiten con los anticuerpos ELISA en la unión al antígeno del ORF2, que, a su vez, interfiere con los ensayos ELISA. Estas preparaciones de vacuna pueden ser verificadas ya sea directamente como formulación de la vacuna o extraídas de la matriz de formulación usando un planteamiento de inmunoprecipitación (IP) o una técnica de purificación de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).

Así, existen múltiples planteamientos para el uso de péptidos firma en la detección y la cuantificación de proteínas en vacunas usando MRM. Estos diferentes planteamientos incluyen:

a. Monitorización de reacción múltiple (MRM) para la cuantificación, por ejemplo, de ORF2 de PCV2 usando un solo péptido

Este método cuantifica directamente la cantidad de una proteína diana sin requerir el uso de anticuerpos (Ab).

Aunque algunas proteínas pueden ser directamente analizadas cuantitativamente usando tecnología LC-MS/MS (es decir, MRM-MS), otras proteínas, como ORF2 de PCV2, son demasiado grandes para un análisis cuantitativo directo. Por lo tanto, tales proteínas pueden ser tratadas consecutivamente de formas diversas para preparar péptidos más pequeños para el análisis por MRM.

En lo que sigue, se expone un procedimiento general para la preparación de una muestra para ORF2 de PCV2, que comprende las siguientes etapas generales: desnaturalización, reducción, alquilación y tripsinización. Sin embargo, un experto en la técnica apreciará que pueden llevarse a cabo de forma rutinaria variaciones en estas etapas preparatorias, en particular usando diferentes enzimas para escindir la proteína. Se habla de una enzima proteolítica típica, la tripsina, con respecto al procedimiento general para llevar a cabo la MRM para cuantificar la cantidad de proteína en una muestra compleja, tal como una matriz de vacuna.

La tripsina corta en los enlaces peptídicos de las cadenas polipeptídicas que siguen específicamente a una arginina (R) o una lisina (K) y genera un repositorio global de péptidos trípticos. Se seleccionan diferentes péptidos trípticos característicos que cumplen los siguientes criterios:

- a. péptidos con secuencias únicas de aminoácidos de la proteína ORF2 de PCV2 de la que se habían escindido;
- b. la cantidad de estos péptidos corresponde estequiométricamente a la cantidad de la proteína ORF2 de PCV2 entera de la que se habían escindido;
- c. tales péptidos son bien ionizados por ionización por electropulverización (ESI) positiva.

Los péptidos así producidos se denominan péptidos “distintivos” endógenos.

Además, la MRM utiliza homólogos de péptidos sintéticos marcados isotópicamente (es decir, péptidos “distintivos” endógenos) como patrones internos para cuantificar la abundancia de péptidos firma endógenos. Las cantidades de proteína se determinan comparando la cantidad de un péptido firma endógeno con una cantidad conocida de un

correspondiente homólogo distintivo exógeno (es decir, un homólogo de péptidos sintéticos marcados isotópicamente). El pesado marcador del homólogo sintético causa un desplazamiento en el espectro de masas en la MRM, lo que permite una comparación directa con el péptido firma endógeno.

5 Después de la digestión triptica de la muestra, se añaden cantidades conocidas de péptidos “distintivos” endógenos al ensayo de digestión. Dado que el análisis de mezclas complejas de péptidos puede simplificarse mediante fases adicionales de separación anteriores a la espectrometría de masas, la mezcla de péptidos es sometida en primer lugar a cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) de fase inversa y los péptidos son estratificados en función de su hidrofobicidad. El propósito de la etapa de cromatografía líquida es extender la administración de péptidos al elemento de electropulverización durante un largo periodo de tiempo para aumentar el número de péptidos que pueden ser
10 identificados.

Subsiguientemente, ambas especies de analitos eluidos —es decir, péptidos firma endógenos y exógenos— son analizadas continuamente en línea en función de la cuantificación por espectrometría de masas de triple cuadrípulo con un instrumento tetrapolar en tándem operado en el modo MRM:

15 Los péptidos son suministrados al espectrómetro de masas a bajo pH (por ejemplo, en ácido fórmico) para convertirlos a la forma catiónica. Los péptidos son ionizados individualmente en la región de origen usando ESI, y dando lugar a iones de analito cargados. Al suministrarse los iones del péptido al espectrómetro de masas, la primera fase muestra una lectura siempre cambiante de m/z (razón de masa a carga) de los diversos péptidos tripticos (el espectro MS1). Las alturas de los picos (corrientes) son funciones de las abundancias de los iones de los péptidos individuales, pero
20 están influenciadas por otras propiedades fisicoquímicas. La información de m/z en los espectros MS1 generalmente no es suficiente para identificar péptidos específicos.

Para llevar a cabo esta tarea, los péptidos seleccionados son sometidos a otro nivel de análisis iniciado por la fragmentación dirigida del ion del péptido “precursor” seleccionado.

25 El método usado más comúnmente para la fragmentación de péptidos es la disociación inducida por colisiones (CID), que generalmente rompe un solo enlace peptídico, fragmentando cada ion del péptido en dos trozos. Sin embargo, el enlace peptídico específico roto en un ion de péptido precursor dado es variable, produciendo multitud de fragmentos. Así, la CID crea series complementarias de iones de tipo b e y de fragmentos. Los iones b contienen el terminal NH₂ a través del sitio de fragmentación; los iones y contienen el terminal COOH a través del sitio de fragmentación.

30 El espectrómetro de masas muestra lo que se denomina “espectro de fragmentación” (espectro MS2; parte inferior). Aquí, la diferencia en m/z entre picos adyacentes de la serie b o y es exactamente la masa residual del aminoácido presente en un fragmento, pero ausente en el otro. Así, la diferencia entre el pico y1-10 ($m/z = 1,276,4$) y el pico y1-9 ($m/z = 1.147,4$) es exactamente la masa residual de un ácido glutámico (E; 129,0 Da).

35 En teoría, la secuencia de péptidos podría ser leída directamente del espectro MS2. Sin embargo, en la práctica, un ordenador usa el espectro MS2 junto con la m/z del ion del péptido precursor para compararlo con todos los espectros teóricos de la especie proteínica apropiada para identificar el péptido triptico y la proteína de origen. La base de datos de los espectros teóricos del péptido se genera a partir de la digestión triptica *in silico* de todas las secuencias de aminoácidos derivadas de la base de datos de secuenciación de proteínas de una sola especie apropiada.

Por ejemplo, el marco abierto de lectura 2 (ORF2) del circovirus porcino 2 (PCV2) tiene la secuencia de aminoácidos:

MTYPRRRYRRRRHRPRSHLGQILRRRPWLVHPRHRYRWRRKNGIFNTRLSRT
 FGYTVKATTVTTPSWAVDMMRFNIDDFVPPGGGTNKISIPFEYYRIRKVKVEF
WPCSPITQGDRGVGSTAVILDDNFVTKATALTYDPYVNYSSRHTIPQPFYSYHS
 RYFTPKPVLVDSTIDYFQPNNKRNQLWRLQLTSRNVHDVGLGTAFENSKYDQD
 YNIRVTMYVQFREFNLKDPPEP (SEC ID N° 1)

40 dentro de la cual el péptido triptico único VEFWPCSPITQGDR (subrayado arriba; SEC ID N° 24) tiene una señal más intensa que otros péptidos de ORF2 de PCV2 y se lo considera un “péptido firma” para el ORF2 de PCV2. Este péptido puede ser marcado con un isótopo pesado; por ejemplo, ¹³C y/o ¹⁵N. Puede usarse una cantidad conocida del péptido firma marcado para marcar una muestra de la digestión con tripsina de PCV2 (por ejemplo, INGELVAC® CIRCOFLEX®). A continuación, se realiza una monitorización de reacción múltiple MS (MRM-MS) con la muestra marcada usando protocolos típicos (véase más abajo).

45 En el primer cuadrípulo (Q1), se selecciona el péptido firma para que pase. Posteriormente, el péptido firma es fragmentado de la proteína PCV2 en el segundo cuadrípulo (Q2). En el tercer cuadrípulo (Q3) solo se analizan los fragmentos seleccionados que se generan en el Q2. Los resultados permiten la cuantificación de la razón entre el péptido firma no marcado o “ligero” y el péptido firma marcado o “pesado”. Este análisis puede ser repetido con

múltiples cantidades de cantidades conocidas de péptidos marcados con una desconocida para generar una curva patrón para la cuantificación absoluta. Usando la razón entre el péptido firma pesado y el ligero, puede calcularse la cantidad de proteína PCV2 presente en la muestra inicial.

5 Los datos muestran que no hay interferencia alguna del segundo plano en el canal monitorizado de MRM. La MRM puede cuantificar el ORF2 de PCV2 en función de la cuantificación de péptidos proteolíticos como sustitutos del correspondiente ORF2 intacto.

b. Cuantificación, por ejemplo, de las VLP intactas del ORF2 de PCV2 con múltiples péptidos firma

10 Usando MRM, pueden usarse múltiples péptidos firma para cuantificar directamente la proteína del ORF2 de PCV2 en la vacuna combinada fijada para garantizar que la proteína del ORF2 de PCV2 está intacta. Si la señal disminuyó con respecto a uno de los péptidos firma, entonces se degrada el ORF2 de longitud máxima. En la secuencia de ORF2 que sigue, los péptidos firma están subrayados.

MTYPRRRYRRRRHRPRSHLGQILRRRPWL^VHPRHR^YRWRRKNGIFN^TRLSRT
 FGYTVKATTVTTPSWAVDMMRFNIDDFVPPGGGTNKISIPFEYYRIRKVKVEF
 WPCSPITQGDRGVG^STAVILDDNFVTKATALTYDPYVNYSSRHTIPQPF^SYHS
 RYFTP^KPVLDSTIDYFQPN^NKRNQLWLRLQTSRNV^DHVGLGTAFENSKYDQD
 YNIRVTMYVQFRE^FNLKDPPLEP (SEC ID N° 1)

Por ejemplo, tres de los péptidos trípticos característicos o distintivos pueden ser usados para monitorizar el ensayo: uno como péptido primario para la cuantificación y otros dos como péptidos secundarios para la confirmación cualitativo. Para el PCV2, las secuencias peptídicas son, por ejemplo, las siguientes:

15 Péptido primario: VEFWPCSPITQGDR (SEC ID N° 24)

Péptido secundario 1: ISIPFEYYR (SEC ID N° 26)

Péptido secundario 2: NVDHVGLGTAFENSK (SEC ID N° 4)

20 El ensayo también incorpora patrones internos (IS), que son péptidos firma, marcados con isótopos estables, para los tres péptidos diana, y en el análisis se usan las razones asociadas de respuesta analito/IS. Las secuencias de patrones internos/péptidos firma son las siguientes:

I.S. primario usado para la cuantificación: ORF2 (P1*) (VEFWPCSPITQGDR (+10Da)) (SEC ID N° 24)

25 I.S. secundario usado cualitativamente: ORF2 (P2*) (ISIPFEYYR (+10Da)) (SEC ID N° 26)

I.S. secundario usado cualitativamente: ORF2 (P3*) (NVDHVGLGTAFENSK (+8Da)) (SEC ID N° 4)

Las VLP del ORF2 de PCV2 pueden ser extraídas de muestras de vacuna por cromatografía de exclusión por tamaño y, a continuación, si se desea, puede usarse la MRM para cuantificar absolutamente las VLP.

30 **c. Cuantificación y diferenciación de VLP antigénicamente similares —por ejemplo, PCV2a y PCV2b— usando IP-MRM**

35 PCV2a y PCV2b son subtipos antigénicos de VLP sin envoltura antigénicamente similares, pero no idénticas. De modo similar, los subtipos de VLP del ORF2 de PCV2a y del ORF2 de PCV2b VLP son antigénicamente similares, pero no son idénticos en el ámbito de los aminoácidos. La vacuna deseada de ORF2 de PCV2 contendrá una mezcla de VLP que comprende subtipos tanto de ORF2 de PCV2a como de ORF2 de PCV2b.

40 Normalmente, se usaría un método ELISA para determinar el contenido relativo de antígeno (RAC) o la potencia relativa (RP) de los dos subtipos diferentes de ORF2 de PCV2 en una vacuna. Sin embargo, un ensayo ELISA capaz de diferenciar los niveles de inclusión de PCV2a y PCV2b requeriría dos MAb diferentes (un MAb que reacciona únicamente a PCV2a, y el otro MAb reacciona solo a PCV2b). Sin embargo, la generación de dos MAb distintos que sean capaces de diferenciar entre las dos VLP antigénicamente similares PCV2a y PCV2b sería una tarea muy difícil, probablemente imposible.

La IP-MRM permite el uso de anticuerpos policlonales que se unen tanto a PCV2a como a PCV2b, seguido por la diferenciación y la cuantificación subsiguientes de las cantidades de PCV2a y PCV2b por MRM.

45 En el planteamiento de la IP, se añaden anticuerpos policlonales anti-ORF2 a la muestra de la vacuna, se deja que se unan al ORF2, y los complejos resultantes de ORF2-Pab son capturados en perlas magnéticas recubiertas con

proteína G. Dado que el ORF2 es demasiado grande para un análisis cuantitativo directo práctico usando tecnología LC-MS/MS, las proteínas unidas son sometidas a una proteólisis “sobre la perla” con tripsina, siguiendo etapas típicas de procesamiento de desnaturalización, reducción y alquilación de proteínas. Los fragmentos de péptido característico producidos por este procedimiento pueden ser cuantificados a continuación como sustitutos de la proteína del ORF2 mediante LC-MS/MS (espectrometría de masas con cromatografía líquida-monitorización de reacción múltiple, o MRM) con la sensibilidad, la especificidad y la precisión y la exactitud requeridas.

d. Cuantificación, por ejemplo, de VLP de ORF2 de PCV2 por (IP)-MRM de inmunofinidad

La IP-MRM incorpora el uso de antisuero policlonal o de un anticuerpo monoclonal (MAb) específico dirigido contra una partícula de tipo viral (VLP), una partícula de tipo núcleo (CLP), o una proteína/péptido inmunológicamente relevante. Este método es útil para la cuantificación y/o la determinación de la potencia relativa (RP) de los niveles de inclusión de las VLP, las CLP, y las proteínas inmunológicamente relevantes en vacunas. Este método usa una combinación de ELISA con MRM. Por ejemplo, usando técnicas típicas, se une un Ab monoclonal biotinilado anti-ORF2 de PCV2 a placas ELISA recubiertas con estreptavidina. Los Ab son bloqueados; a continuación, se carga ORF2 de PCV2 de una vacuna —por ejemplo, INGELVAC® CIRCOFLEX® MYCOFLEX®, que comprende antígenos, respectivamente, contra PCV2 y *M. hyo*— y se deja que se una a las placas. Usando técnicas típicas, las VLP del ORF2 son liberadas de la placa e inyectadas en una LC-MRM y cuantificadas.

e. Cuantificación, por ejemplo, de VLP de ORF2 de PCV2 por cromatografía de exclusión por tamaños (SEC)-MRM

De forma similar al procedimiento de IP-MRM, pero sin valerse del uso de anticuerpos, el uso de SEC como etapa previa garantiza que en una muestra que ha de ser medida solo hay presente VLP o CLP interna, ya que únicamente una estructura intacta de VLP o CLP pasará a la fracción vacía. La SEC-MRM permite la separación de VLP a partir de una matriz compleja con altos niveles de proteínas extrañas no relevantes. Este método está libre de anticuerpos. Si existe la posibilidad de que una tanda de antígeno contenga tanto VLP intactas como VLP degradadas, la adición de la etapa de SEC garantiza que en la porción de MRM del ensayo únicamente se medirán las VLP intactas (es decir, VLP verdaderas).

En las solicitudes anteriores, se hizo referencia específica a la identificación del ORF2 of PCV2. Sin embargo, los métodos de la invención también pueden ser aplicados a la detección y la cuantificación de otras vacunas, incluyendo las proteínas no análogas de esas vacunas, incluyendo, sin limitación:

f. Cuantificación, con IP-MRM, de VLP monoméricas de PPV VP2 sin envoltura

Las VLP de parvovirus porcino (PPV) VP2 pueden ser cuantificadas, como anteriormente, para cuantificar la cantidad de subtipos antigénicos de VLP antigénicamente similar, pero no idénticas (es decir, diferenciación cuantitativa de VLP de NADL PPV de IDT27, otra VLP de PPV) en una vacuna que contiene ambos antígenos. En el planteamiento de la IP, se añaden anticuerpos monoclonales o policlonales anti-PPV a la muestra de la vacuna, se deja que se unan a la VLP de PPV VP2, y los complejos resultantes de anticuerpo-VLP de PPV VP2 son capturados en perlas magnéticas recubiertas con proteína G. Dado que la VLP de PPV VP2 es demasiado grande para un análisis cuantitativo directo práctico usando tecnología LC-MS/MS, las proteínas unidas son sometidas a una proteólisis “sobre la perla” con tripsina, siguiendo etapas típicas de procesamiento de desnaturalización, reducción y alquilación de proteínas.

g. Cuantificación, con IP-MRM, de VLP diméricas sin envoltura

Las VLP del calicivirus felino (FCV) (que comprende VP1 y VP2) pueden ser cuantificadas, como anteriormente, para cuantificar la cantidad de subtipos antigénicos de VLP antigénicamente similares, pero no idénticas (es decir, la diferenciación cuantitativa de FCV DD1 del IFCV 666). En el planteamiento de la IP, se añaden anticuerpos monoclonales o policlonales anti-FCV a la muestra de la vacuna, se deja que se unan a la VLP de FCV, y los complejos resultantes de anticuerpo-VLP de FCV son capturados en perlas magnéticas recubiertas con proteína G. Dado que la VLP de FCV es demasiado grande para un análisis cuantitativo directo práctico usando tecnología LC-MS/MS, las proteínas unidas son sometidas a una proteólisis “sobre la perla” con tripsina, siguiendo etapas típicas de procesamiento de desnaturalización, reducción y alquilación de proteínas.

Vacuna contra el norovirus: cuantificación de VLP de múltiples subtipos de una mezcla de VLP antigénicamente similares, pero no idénticas, en una vacuna. En el planteamiento de la IP, se añaden anticuerpos monoclonales o policlonales anti-norovirus a la muestra de la vacuna, se deja que se unan a la VLP del norovirus, y los complejos resultantes de anticuerpo-VLP de norovirus son capturados en perlas magnéticas recubiertas con proteína G. Dado que la VLP del norovirus es demasiado grande para un análisis cuantitativo directo práctico usando tecnología LC-MS/MS, las proteínas unidas son sometidas a una proteólisis “sobre la perla” con tripsina, siguiendo etapas típicas de procesamiento de desnaturalización, reducción y alquilación de proteínas.

Vacuna contra el rotavirus: cuantificación de VLP de múltiples subtipos de una mezcla de VLP antigénicamente similares, pero no idénticas, en una vacuna. En el planteamiento de la IP, se añaden anticuerpos monoclonales o policlonales anti-rotavirus a la muestra de la vacuna, se deja que se unan a la VLP del rotavirus, y los complejos resultantes de anticuerpo-VLP de rotavirus son capturados en perlas magnéticas recubiertas con proteína G. Dado

que la VLP del rotavirus es demasiado grande para un análisis cuantitativo directo práctico usando tecnología LC-MS/MS, las proteínas unidas son sometidas a una proteólisis “sobre la perla” con tripsina, siguiendo etapas típicas de procesamiento de desnaturalización, reducción y alquilación de proteínas.

h. Cuantificación, con IP-MRM o SEC-MRM, de VLP multiméricas sin envoltura

- 5 La VLP del virus de la lengua azul (BTV) se compone de una partícula interior de tipo núcleo (CLP) hecha de VP3 y VP7, y una cápside exterior de VP2 y VP5. Significativamente, las CLP no inducen anticuerpos neutralizantes en un animal vacunado. La VLP intacta es la forma preferida del antígeno, ya que los anticuerpos neutralizantes son dirigidos a VP2 y VP5, que comprenden la capa exterior de la VLP. Hay al menos 24 serotipos de BTV distribuidos en todo el mundo, y la vacuna óptima de VLP de BTV contendría VLP de muchos serotipos diferentes.
- 10 Puede usarse SEC-MRM o IP-MRM para la diferenciación cuantitativa de niveles de antígeno en una vacuna polivalente que tenga una mezcla de muchas VLP de BTV. La SEC recogería tanto CLP como VLP en la fracción vacía. Sin embargo, puede usarse la MRM para medir las cantidades exactas de VP3, VP7, VP2 y VP5 en la fracción vacía, y las razones de VP3, VP7, VP2 y VP5 pueden ser usadas para determinar el porcentaje de CLP y VLP presente en la muestra. Tal diferenciación sería necesaria para satisfacer las necesidades normativas y para garantizar dosis apropiadas (es decir, la potencia relativa) en un producto comercial.
- 15

i. Cuantificación, con IP-MRM, de partículas de núcleo de HepB sin envoltura

- La nucleoproteína del virus de la hepatitis B (HBV) existe en dos formas estructurales. La nucleocápside, denominada antígeno del núcleo de la hepatitis (HBcAg), es una proteína que se autoensambla en partículas que encapsidan el genoma viral y la polimerasa y es esencial para la función y la maduración del virión. Una segunda forma secretada no particulada de la nucleoproteína se denomina antígeno de prenúcleo o de la hepatitis B e (HBeAg). El HBcAg y el HBeAg son reconocidos de manera diferenciada por los anticuerpos, pero, debido a su gran homología en aminoácidos, tienen mucha reactividad cruzada en el ámbito de los linfocitos T.
- 20

- Pueden usarse partículas de núcleo partido de HepB (HepBsc) para mostrar proteínas o péptidos inmunogénicos/inmunomoduladores en la superficie del HepBsc. Puede usarse SEC-MRM o IP-MRM para cuantificar la cantidad y/o la razón de partículas de HepBsc y su diana mostrada presente en una vacuna.
- 25

j. Cuantificación, con IP-MRM, de la proteína portadora de VLP del ORF2 de PCV2 sin envoltura

- Pueden usarse partículas VLP del ORF2 de PCV2 como portador de proteínas o péptidos inmunogénicos/inmunomoduladores. Podría usarse SEC-MRM o IP-MRM para cuantificar la cantidad y/o la razón de VLP del ORF2 de PCV2 y su diana mostrada presente en una vacuna.
- 30

k. Cuantificación, con IP-MRM, de la VLP basada en la M de la gripe, con envoltura

- La proteína matriz (M) de la gripe puede formar estructuras VLP con envoltura. Antígenos inmunológicamente relevantes como la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (N) pueden estar anclados en la envoltura de la VLP y su dominio transmembranal nativo. Preferiblemente, cualquier vacuna basada en VLP de la gripe contendría varias proteínas HA y N (por ejemplo, H1 o H3 y N1 o N2; similar a lo hallado en las vacunas anuales contra la gripe humana). Las VLP basadas en M no están limitadas a transportar únicamente antígenos de la gripe, ya que estas VLP pueden incorporar proteínas ancladas en el dominio transmembranal procedentes de otros virus (por ejemplo, la glicoproteína de la rabia G). Podría usarse SEC-MRM o IP-MRM para cuantificar la cantidad del antígeno de la proteína viral.
- 35

l. Cuantificación, con IP-MRM, de las VLP de antígenos mostrados en baculovirus

- Antígenos inmunológicamente relevantes como la hemaglutinina (HA), la neuraminidasa (N) o la rabia G pueden estar anclados en la envoltura del baculovirus por su dominio transmembranal nativo. Tal baculovirus recombinante podría ser la base de una vacuna terapéutica.
- 40

Podría usarse SEC-MRM o IP-MRM para cuantificar la diana mostrada presente en una vacuna. Además, puede usarse SEC-MRM o IP-MRM para cuantificar la cantidad y/o la razón de gp64 (la proteína fundamental de la envoltura del baculovirus) asociada con el baculovirus y su diana mostrada presente en una vacuna.

45

m. Cuantificación, con IP-MRM, de VLP basadas en gag retroviral, con envoltura

- La proteína gag de los retrovirus puede formar estructuras VLP con envoltura. Antígenos inmunológicamente relevantes como la hemaglutinina (HA), la neuraminidasa (N) o la rabia G pueden estar anclados en la envoltura del baculovirus por su dominio transmembranal nativo. Puede usarse SEC-MRM o IP-MRM para cuantificar la cantidad del antígeno de la proteína viral.
- 50

n. Combinaciones de MRM con etapas adicionales; por ejemplo, la prepurificación y/o la detección simultánea de proteínas adicionales

Además de la detección del ORF2 de PCV2 de la SEC ID N° 1, el método de la invención puede ser usado para

detectar y cuantificar subtipos de dicho virus; por ejemplo, en una vacuna polivalente. PCV2a y PCV2b son subtipos antigénicos de VLP antigénicamente similares, pero no idénticas. De forma similar, los subtipos de las VLP del ORF2 de PCV2a y del ORF2 de PCV2b son antigénicamente similares, pero no idénticos en el ámbito de los aminoácidos. La vacuna deseada de ORF2 de PCV2 contendrá una mezcla de VLP que comprende subtipos tanto de ORF2 de PCV2a como de ORF2 de PCV2b.

Normalmente, se usaría un método ELISA para determinar el contenido relativo de antígeno (RAC) o la potencia relativa (RP) de los dos subtipos diferentes de ORF2 de PCV2 en una vacuna. Sin embargo, un ensayo ELISA capaz de diferenciar los niveles de inclusión de PCV2a y PCV2b requeriría dos MAb diferentes (un MAb que reacciona únicamente a PCV2a, y el otro MAb reacciona solo a PCV2b). Sin embargo, la generación de dos MAb distintos que sean capaces de diferenciar entre las dos VLP antigénicamente similares PCV2a y PCV2b sería una tarea muy difícil, probablemente imposible.

La IP-MRM permite el uso de anticuerpos policlonales que se unen tanto a PCV2a como a PCV2b, seguido por la diferenciación y la cuantificación subsiguientes de las cantidades de PCV2a y PCV2b por MRM.

La SEC ID N° 1 es la secuencia de aminoácidos del ORF2 de longitud máxima del subtipo más común de PCV2, también denominado subtipo de PCV2a de PCV:

1 MTYPRRRYRRRRHRPRSHLGQILRRRPWLHVHPRHRYRWRRKNGIFNTRLS
 51 RTFGYTVKATTVTTPSWAVDMMRFNIDDFVPPGGGTNKISIPFEYYRIRK
 101 VKVEFWPCSPITQDGRGVGSTAVILDDNFVTKATALTYDPYVNYSSRHTI
 151 PQPFSYHSRYFTP~~PKP~~VLDSTIDYFQPNNKRNQLWLRLQTSRNVDHVGLGT
 201 AFENSKYDQDYNIRVTMYVQFREFNLKDPPLEP

La SEC ID N° 2 y la SEC ID N° 3 son variantes de la secuencia de aminoácidos del ORF2 de PCV2b:

1 MTYPRRRYRRRRHRPRSHLGQILRRRPWLHVHPRHRYRWRRKNGIFNTRLS
 51 RTFGYTIKRTTVRTPSWAVDMMRFNINDFLPPGGGSNPRSVPFEYYRIRK
 101 VKVEFWPCSPITQDGRGVGSSAVILDDNFVTPKATALTYDPYVNYSSRHTI
 151 TQPFSYHSRYFTP~~PKP~~VLDGTIDYFQPNNKRNQLWLRLQTAGNVDHVGLGT
 201 AFENSIYDQEYNIRVTMYVQFREFNLKDPPLNP (SEC ID N° 2);

y

MTYPRRRFRRRHRPRSHLGQILRRRPWLHVHPRHRYRWRRKNGIFNTRLSRTIGYTVKKTVT
 TPSWNVDMRFNINDFLPPGGGSNPLTVPFYRIRKVKVEFWPCSPITQDGRGVGSTAVILD
 DNFVTKANALTYDPYVNYSSRHTITQPFSYHSRYFTP~~PKP~~VLDRTIDYFQPNNKRNQLWLRLQT
 TGNVDHVGLGTAFENSIYDQDYNIRITMYVQFREFNLKDPPLNPK (SEC ID N° 3).

Las secuencias en negrita/subrayadas son "péptidos firma" para las respectivas proteínas.

o. Identificación de los péptidos firma para la identificación por MRM

Los métodos de la invención dependen de poder identificar secuencias dentro de la diana proteínica en una mezcla de otros componentes que son específicos para una proteína particular en la mezcla.

En una realización, la secuencia de la diana proteínica es analizada con un soporte lógico que determina las secuencias de péptidos que son producidos con diversas enzimas. Preferiblemente, esos péptidos son únicos a la proteína deseada para ser detectados y comparados con la composición en la que la proteína deseada está presente, y los péptidos no son demasiado pequeños ni grandes hasta el punto de que no sean adecuados para ser usados como péptidos firma.

A pesar de esta orientación general en la selección de péptidos firma adecuados para ser usados en la presente divulgación, la confirmación de la utilidad de los péptidos firma requiere confirmación experimental. Por ejemplo, dos de los tres péptidos tripticos que el soporte lógico ABI MultiQuant (versión 1.0) sugirió inicialmente que serían los que con mayor probabilidad resultarían útiles en la presente divulgación se comportaron como se preveía. Sorprendentemente, aunque el péptido ISIPFEYYR (SEC ID N° 26) tenía la señal más intensa entre los tres péptidos escogidos para cuantificar la concentración de proteínas del ORF2 en los experimentos iniciales, este péptido no llegó a tener las características requeridas para el análisis cuantitativo, quizá debido a la interferencia imprevista con una

proteína del suero porcino.

p. Preparación de muestras para la identificación por MRM

Si es necesario, pueden usarse diversas técnicas de preparación de muestras para purificar las muestras antes del análisis por MRM para mejorar la calidad de la señal. Estas técnicas incluyen, por ejemplo, inmunoafinidad, inmunoprecipitación y cromatografía de exclusión por tamaños.

Definiciones

A no ser que se defina algo distinto, todos los términos técnicos y científicos tienen en la presente memoria el mismo significado que entiende comúnmente una persona experta en la técnica a la que pertenece la presente invención en el momento de su presentación. El significado y el alcance de los términos deberían estar claros; sin embargo, en caso de cualquier ambigüedad latente, las definiciones proporcionadas en la presente memoria toman precedencia sobre cualquier definición de diccionario o extrínseca. Además, a no ser que se requiera algo distinto por el contexto, las formas singulares incluirán pluralidades y los términos plurales incluirán el singular. En la presente memoria, el uso de “o” significa “y/o”, a no ser que se indique algo distinto. Además, el uso de la expresión “que incluye”, así como otras formas, como “incluye” e “incluido”, no es limitante.

“Proteína” se refiere a cualquier proteína sin limitación y, preferiblemente, incluye las comprendidas por al menos más de 50 aminoácidos.

“Péptido” se refiere a polipéptidos más cortos y, preferentemente, incluye los que comprenden 50 aminoácidos o menos; por ejemplo entre 4 y 50 aminoácidos, o entre 10 y 24 aminoácidos.

“Proteína analito” y “péptido analito” se refieren a la proteína o al péptido específicos que han de ser cuantificados.

“Péptido firma” incluye tanto un péptido firma endógeno preparado a partir de la proteína o péptido analito mediante fragmentación por proteasas o fragmentación química, como un péptido exógeno o sintético que contiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a una secuencia en una proteína conocida o predicha que ha de ser analizado y que está marcado de tal modo que el péptido firma exógeno es idéntico o casi idéntico al péptido endógeno generado a partir de la proteína o de las proteínas que han de ser analizadas, tras su fragmentación por proteasas o productos químicos, salvo por una masa molecular ligeramente diferente. La modificación química del patrón interno peptídico marcado por masa es, preferiblemente, una incorporación de un isótopo estable. En este caso, el péptido firma exógeno y el péptido firma endógeno fragmentado de la proteína analito serán idénticos, salvo por una masa molecular ligeramente diferente.

“Vacuna” se refiere a una composición inmunogénica que, cuando es administrada a un animal, provoca, o es capaz de provocar —directa o indirectamente— una respuesta inmunitaria eficaz en el animal contra un antígeno en la composición; por ejemplo, un antígeno que provoque una respuesta inmunitaria a un organismo patógeno. Preferentemente, tal respuesta inmunitaria reduce la incidencia o la gravedad de uno o más signos clínicos asociados con la infección con uno o más organismos patógenos o causados por ella.

“Antígeno” se refiere a un polipéptido o proteína que provoca una respuesta inmunitaria según se describe en la presente memoria. Un polipéptido o proteína “inmunogénico” incluye la secuencia de longitud máxima de cualquiera de los polipéptidos o proteínas identificados en la presente memoria o análogos o fragmentos inmunogénicos de los mismos. La expresión “fragmento inmunogénico” o “porción inmunogénica” se refiere a un fragmento o a una forma truncada y/o sustituida de un antígeno o proteína inmunogénica o a un polipéptido que incluye uno o más epítomos y que, así, provoca la respuesta inmunitaria descrita en la presente memoria. En general, tales fragmentos o formas truncados y/o sustituidos comprenderán al menos seis aminoácidos contiguos procedentes de la proteína de longitud máxima. Más preferentemente, los fragmentos o formas truncados o sustituidos tendrán al menos 10, más preferentemente al menos 15, y aún más preferentemente al menos 19 aminoácidos contiguos procedentes de la proteína de longitud máxima.

Una “respuesta inmunitaria” o “respuesta inmunológica” significa, sin limitación, el desarrollo de respuesta inmunitaria celular o arbitrada por anticuerpos a la composición o a la vacuna de interés. Habitualmente, una respuesta inmunitaria o inmunológica incluye, sin limitación, uno o más de los siguientes efectos: la producción o la activación de anticuerpos, linfocitos B, linfocitos T colaboradores, linfocitos T supresores, y/o linfocitos T citotóxicos, dirigidos específicamente a un antígeno o a antígenos incluidos en la composición o vacuna de interés. Preferentemente, el anfitrión mostrará una respuesta ya sea terapéutica o protectora inmunológica (de recuerdo), de modo que se potencie la resistencia a una nueva infección y/o que se reduzca la gravedad clínica de la enfermedad. Tal protección se demostrará bien por una reducción en el número de síntomas, o de la gravedad de los síntomas, o por la ausencia de uno o más de los síntomas asociados con la infección del patógeno, por un retraso en el inicio de la viremia, por una persistencia viral reducida, por una reducción en la carga viral total y/o por una reducción de la excreción viral.

Un “vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable” se refiere a disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, adyuvantes, estabilizantes, diluyentes, conservantes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, agentes retardadores de la adsorción cualesquiera, y a todos ellos, y similares. En algunas realizaciones

preferidas, y especialmente en las que incluyen composiciones inmunogénicas liofilizadas, los estabilizantes para el uso en la presente invención incluyen estabilizantes para la liofilización o secado por congelación.

“Adyuvantes”, según se usa en la presente memoria, puede incluir hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio, saponinas —por ejemplo, Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge Massachusetts), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, Alabama)—, emulsión de agua en aceite, emulsión de aceite en agua, emulsión de agua en aceite en agua. La emulsión puede estar basada en particular en aceite de parafina líquida ligera (tipo de la farmacopea europea); en aceite isoprenoide, como escualeno; aceite resultante de la oligomerización de alquenos, en particular de isobuteno o deceno; ésteres de ácidos o de alcoholes que contengan un grupo alquilo lineal, más en particular aceites vegetales, oleato etílico, di-(caprilato/caprato) de propilenglicol, tri-(caprilato/caprato) de glicerilo o dioleato de propilenglicol; ésteres de alcoholes o ácidos grasos ramificados, en particular ésteres de ácido isoesteárico. El aceite se usa en combinación con emulsionantes para formar la emulsión. Los emulsionantes son, preferentemente, tensioactivos no iónicos, en particular ésteres de sorbitano, de manide (por ejemplo, oleato de anhidromanitol), de glicol, de poliglicerol, de propilenglicol y de ácido oleico, isoesteárico, ricinoleico o hidroxiesteárico, que, opcionalmente, están etoxilados, y bloques de copolímero de polioxipropileno-polioxitileno, en particular los productos Pluronic, especialmente L121. Véanse Hunter *et al.*, *The Theory and Practical Application of Adjuvants* (Ed. Stewart-Tull, D. E. S.), John Wiley and Sons, Nueva York, pp. 51-94 (1995) y Todd *et al.*, *Vaccine* 15:564-570 (1997). Adyuvantes ejemplares son la emulsión SPT, descrita en la página 147 de “*Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach*”, editado por M. Powell y M. Newman, Plenum Press, 1995, y la emulsión MF59, descrita en la página 183 de ese mismo libro.

Un caso adicional de un adyuvante es un complejo elegido entre los polímeros de ácido acrílico o metacrílico y los copolímeros de anhídrido maleico y un derivado alquenílico. Compuestos adyuvantes ventajosos son polímeros de ácido acrílico o metacrílico que estén reticulados, especialmente con éteres polialquenílicos de azúcares o polialcoholes. Estos compuestos son conocidos por el término carbómero (Pharmeuropa, Vol. 8, n° 2, junio de 1996). Las personas expertas en la técnica también pueden remitirse a la patente estadounidense n° 2.909.462, que describe tales polímeros acrílicos reticulados con un compuesto polihidroxilado que tiene al menos 3 grupos hidroxilo, preferiblemente no más de 8, estando sustituidos los átomos de hidrógeno de al menos tres hidroxilos con radicales alifáticos insaturados que tienen al menos 2 átomos de carbono. Los radicales preferidos son los que contienen de 2 a 4 átomos de carbono; por ejemplo, vinilos, alilos y otros grupos etilénicamente insaturados. Los propios radicales insaturados pueden contener otros sustituyentes, como metilo. Los productos vendidos con el nombre Carbopol (BF Goodrich, Ohio, EE. UU.) son particularmente apropiados. Están reticulados con sacarosa analítica o con pentaeritritol de alilo. Entre ellos, pueden mencionarse Carbopol 974P, 934P y 971P. Se prefiere especialmente el uso de Carbopol 971P. Entre los copolímeros de anhídrido maleico y un derivado alquenílico se encuentran los copolímeros EMA (Monsanto), que son copolímeros de anhídrido maleico y etileno. La disolución de estos polímeros en agua conduce a una solución ácida que se neutralizará, preferiblemente a un pH fisiológico, para producir la solución adyuvante en la que se incorporará la propia composición inmunogénica, inmunológica o de vacuna.

Adyuvantes adecuados adicionales incluyen, sin limitación, el sistema de adyuvantes RIBI (Ribi Inc.), un copolímero de bloques (CytRx, Atlanta, Georgia), SAF-M (Chiron, Emeryville, California), el monofosforil lípido A, adyuvante de amina lipídica de avridina, enterotoxina termolábil de *E. coli* (recombinante o no), toxina del cólera, IMS 1314 o muramil dipéptido, o citoquinas naturales o recombinantes o análogos de las mismas, o estimulantes de la liberación de citoquinas endógenas, entre muchos otros.

Los “diluyentes” pueden incluir agua, suero fisiológico, dextrosa, etanol, glicerol y similares. Los agentes isotónicos pueden incluir cloruro sódico, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa, entre otros. Los estabilizantes incluyen albúmina y sales alcalinas de ácido etilendiaminotetraacético, entre otros.

“Matriz de vacuna” o “matriz de formulación” o “matriz de segundo plano” se refieren todas a los adyuvantes, excipientes, diluyentes, agentes isotónicos, estabilizantes u otros materiales de una vacuna formulada para su inyección en un animal, distintos del antígeno específico. Esos materiales pueden contener elementos que interfieren en la detección y/o en la cuantificación precisa de un segundo antígeno de vacuna en una vacuna combinada usando un ensayo convencional; por ejemplo, por la presencia de anticuerpos procedentes del suero usado en la fabricación del componente de vacuna, o de otros materiales que compiten con el segundo antígeno de vacuna para su unión a los anticuerpos usados en un inmunoensayo ELISA.

Métodos para la identificación y la síntesis de péptidos firma

En la técnica se conocen métodos generales para la identificación y la síntesis de péptidos firma; por ejemplo, según describe el documento WO200600281.

La invención proporciona un método para la medición cuantitativa de péptidos generados a partir de proteínas intactas de vacunas en mezclas complejas que contienen componentes que interfieren con elementos asociados de unión específica, como los ensayos ELISA basados en anticuerpos, en los que los péptidos se generan por fragmentación enzimática o química, utilizando péptidos firma marcados por masa. El péptido firma marcado por masa contiene una secuencia de aminoácidos idéntica o casi idéntica al fragmento de proteína de la vacuna del analito generado por tal fragmentación. La fragmentación de la proteína de la vacuna del analito produce un péptido analizable de la proteína,

siendo la única diferencia entre el péptido analizable y el péptido firma marcado por masa, desde una perspectiva analítica, un cambio de masa normalmente de 2-10 daltones.

Al usar un péptido firma cambiado en masa, se logran ventajas: i) el precursor del patrón interno puede ser diseñado para purificarse juntamente con la proteína analito o el péptido analito durante cualquiera de diversas etapas opcionales de preparación de muestras realizadas antes de la fragmentación de la proteína; y ii) un único precursor del patrón interno puede ser diseñado para generar péptidos del patrón internos para el análisis de fragmentos de péptidos que se originan a partir de varias proteínas analito o péptidos analito diferentes.

El péptido firma marcado por masa puede ser generado por síntesis de péptidos, durante la cual se incorporan uno o más aminoácidos marcados por masa. Preferiblemente, los aminoácidos marcados por masa contienen uno o más isótopos estables, incluyendo, sin limitación, ^{13}C , ^{15}N , ^{18}O , ^2H y ^{34}S .

Los péptidos pueden ser sintetizados por el modo Fmoc-poliámina de síntesis de péptidos en fase sólida, según se da a conocer en Lu *et al.*, (1981) J. Org. Chem. 46, 3433 y en las referencias de dicho documento. El grupo 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc) confiere protección temporal al grupo N-amino. La fragmentación reiterada de este grupo protector muy lábil a bases se efectúa usando piperidina al 20% en N5N-dimetilformamida. Las funcionalidades de cadenas laterales pueden ser protegidas como sus éteres butílicos (en el caso de la serina, la treonina y la tirosina), ésteres butílicos (en el caso del ácido glutámico y el ácido aspártico), un derivado de butiloxycarbonilo (en el caso de la lisina y la histidina), un derivado de trifenilmetano (en el caso de la cisteína) y un derivado de 4-metoxi-2,3,6-trimetilbencenosulfonilo (en el caso de la arginina). Cuando la glutamina o la asparagina son restos C-terminales, se hace uso del grupo 4,4'-dimetoxibenzhidrido para la protección de las funcionalidades amido de la cadena lateral. El soporte en fase sólida está basado en un polímero de polidimetil-acrilamida constituido por los tres monómeros dimetilacrilamida (cadena principal-monómero), bisacriloleileno diamina (reticulante) y éster metílico de acriloisarcosina (agente funcionalizador). El agente enlazado escindible de péptido a resina utilizado es un derivado del ácido 4-hidroximetil-fenoxiacético lábil a ácidos. Todos los derivados de aminoácidos se añaden como sus derivados anhídridos simétricos preformados, con la excepción de la asparagina y la glutamina, que se añaden utilizando un procedimiento de acoplamiento invertido arbitrado por N,N-diciclohexil-carbodiimida/1-hidroxibenzotriazol. Todas las reacciones de acoplamiento y desprotección se monitorizan usando ninhidrina, ácido trinitrobenzeno sulfónico o procedimientos de ensayo de isotina. Una vez completada la síntesis, los péptidos se escinden del soporte de resina con la eliminación concomitante de los grupos protectores de la cadena lateral mediante tratamiento con ácido trifluoroacético al 95% que contiene una mezcla depuradora al 50%. Los depuradores comúnmente usados son etanoditiol, fenol, anisol y agua, dependiendo la elección exacta de los aminoácidos constituyentes del péptido que se sintetiza. El ácido trifluoroacético se elimina por evaporación al vacío, con la posterior trituración con éter dietílico para proporcionar el péptido en bruto. Todos los depuradores presentes se eliminan mediante un simple procedimiento de extracción que en la liofilización de la fase acuosa da el péptido en bruto libre de depuradores. Los reactivos para la síntesis de péptidos están generalmente disponibles en Calbiochem-Novabiochem (UK) Ltd, Nottingham NG7 2QJ, Reino Unido. La purificación puede efectuarse mediante una cualquiera, o una combinación, de técnicas tales como cromatografía de exclusión por tamaños, cromatografía de intercambio iónico y (principalmente) cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa. El análisis de los péptidos se puede llevar a cabo usando cromatografía en capa delgada, cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa, análisis de aminoácidos después de hidrólisis ácida y mediante análisis espectrométrico de masas por bombardeo de átomos rápidos (FAB).

La marca por masa también puede consistir en otras modificaciones químicas de los aminoácidos, incluyendo, sin limitación, acetilación, metilación, desamidación y carboximetilación. Si la modificación de la marca por masa es distinta de la incorporación de isótopos estables, es importante evitar modificaciones que puedan alternar el comportamiento de los péptidos de patrones internos durante la preparación, la separación y la ionización de la muestra.

Además, el péptido firma marcado por masa puede ser sintetizado para que tenga uno o más restos de aminoácido de sustitución con respecto a la proteína o péptido analito; por ejemplo, una alanina en sustitución de una glicina. En tal circunstancia, la fragmentación de la proteína o péptido analito y el precursor del patrón interno peptídico marcado por masa producirá un péptido analizable a partir de la proteína y un péptido de patrón interno a partir del precursor del patrón interno, siendo la única diferencia entre ellos, desde una perspectiva analítica, un cambio de masa debido a la presencia de alanina en el patrón interno peptídico con respecto a la presencia de glicina en la proteína o péptido analito. Una ventaja de tal realización de la invención es que puede ser más fácil sustituir una alanina con una glicina que con una anilina marcada isotópicamente durante la síntesis del precursor del patrón interno peptídico marcado por masa. Una persona experta en la técnica puede apreciar fácilmente sustituciones adicionales adecuadas de aminoácidos; por ejemplo, la valina y la isoleucina pueden ser intercambiadas.

El precursor del patrón interno peptídico marcado por masa puede tener cero, uno, dos, tres, cuatro o cinco restos de aminoácido de sustitución con respecto a la proteína o péptido analito, o puede diferir en hasta un cinco, diez, quince, veinte o veinticinco por ciento del número total de restos de aminoácido con respecto a la proteína o péptido analito. Preferiblemente, el péptido firma marcado por masa tiene cero o un resto de aminoácidos de sustitución con respecto a la proteína o péptido analito.

Si el fragmento de la proteína analito contiene cualquier modificación posterior a la traducción, tal como fosforilación, el péptido firma marcado por masa puede ser sintetizado para que sea modificado idénticamente.

5 Los precursores del patrón interno peptídico marcado por masa también pueden ser generados por expresión de proteínas recombinantes en presencia de aminoácidos marcados por masa como parte de una proteína híbrida, en cuyo caso la proteína híbrida como tal puede constituir el precursor del patrón interno, o la proteína híbrida puede ser procesada para producir uno o más precursores del patrón interno peptídico.

10 Al preparar un péptido firma marcado por masa usando expresión de proteínas recombinantes, se prepara una molécula de ADN que codifica el péptido deseado usando métodos muy conocidos para los expertos en la técnica y ejemplificados por Sambrook *et al.* (2001) "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", 3ª edición, Sambrook *et al.* (ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, EE. UU.

15 A continuación, el ADN es expresado en un anfitrión adecuado para producir un precursor del patrón interno peptídico marcado por masa. Así, el ADN que codifica dicho péptido puede ser usado según técnicas conocidas, debidamente modificadas en consideración de las enseñanzas contenidas en la presente memoria, para construir un vector de expresión, que es usado a continuación para transformar una célula anfitriona apropiada para la expresión y la producción de dicho péptido. Tales técnicas incluyen las dadas a conocer en las patentes estadounidenses n^{os} 4.440.859, expedida el 3 de abril de 1984 a Rutter *et al.*, 4.530.901, expedida el 23 de julio de 1985 a Weissman, 4.582.800, expedida el 15 de abril de 1986 a Crowl, 4.677.063, expedida el 30 de junio de 1987 a Mark *et al.*, 4.678.751, expedida el 7 de julio de 1987 a Goeddel, 4.704.362 expedida el 3 de noviembre de 1987 a Itakura *et al.*, 4.710.463, expedida el 1 de diciembre de 1987 a Murray, 4.757.006, expedida el 12 de julio de 1988 a Toole, Jr. *et al.*, 4.766.075, expedida el 23 de agosto de 1988 a Goeddel *et al.*, y 4,810,648, expedida el 7 de marzo de 1989 a Stalker.

20 El ADN que codifica un péptido firma marcado por masa puede unirse a una amplia variedad de secuencias de ADN adicionales para su introducción en un anfitrión apropiado. El ADN complementario dependerá de la naturaleza del anfitrión, de la forma de introducción del ADN en el anfitrión y de si se desea un mantenimiento o una integración episémicos.

25 Generalmente, el ADN se inserta en un vector de expresión, tal como un plásmido, en la debida orientación y con un marco de lectura correcto para su expresión. Un vector de expresión preferido es un baculovirus, más preferiblemente de un sistema disponible comercialmente. Si es necesario, el ADN puede estar ligado a las debidas secuencias de nucleótidos de control reguladoras de la transcripción y la traducción reconocidas por el anfitrión deseado, aunque tales controles están generalmente disponibles en el vector de expresión. Así, el inserto de ADN puede estar ligado operativamente a un promotor apropiado. Los promotores bacterianos incluyen los promotores *lad* y *lacZ* de *E. coli*, los promotores T3 y T7, el promotor *gpt*, los promotores PR y PL del fago λ , el promotor *phoA* y el promotor *trp*. Los promotores eucariotas incluyen el promotor temprano inmediato de CMV, el promotor de timidina quinasa del HSV, los promotores temprano y tardío de SV40 y los promotores de LTR retrovirales. El experto en la técnica conocerá otros promotores adecuados. Idealmente, los constructos de expresión también contendrán sitios para el inicio y la terminación de la transcripción y, en la región transcrita, un sitio de unión a ribosoma para la traducción. (Hastings *et al.*, Patente Internacional n^o WO 98/16643, publicada el 23 de abril de 1998).

30 A continuación, el vector es introducido en el anfitrión mediante técnicas típicas. Generalmente, no todos los anfitriones serán transformados por el vector y, por lo tanto, será necesario seleccionar las células anfitrionas transformadas. Una técnica de selección implica incorporar en el vector de expresión un marcador de secuencia de ADN, con cualquier elemento de control necesario, que codifique un rasgo seleccionable en la célula transformada. Estos marcadores incluyen dihidrofolato reductasa, G418 o resistencia a la neomicina para cultivos de células eucariotas, y genes de resistencia a la tetraciclina, a la kanamicina o a la ampicilina para el cultivo de *E. coli* y otras bacterias. Alternativamente, el gen para tal rasgo seleccionable puede estar en otro vector, que se usa para cotransformar la célula huésped deseada.

35 Las células anfitrionas que han sido transformadas por el ADN recombinante que codifica un péptido firma marcado por masa se cultivan a continuación durante un tiempo suficiente y en condiciones apropiadas conocidas por los expertos en la técnica permiten la expresión del polipéptido, que luego puede ser recuperado.

40 El péptido firma marcado por masa puede ser recuperado y purificado a partir de cultivos celulares recombinantes mediante métodos muy conocidos que incluyen sulfato de amonio o precipitación con etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía en fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía en hidroxilapatita y cromatografía en lectina. Lo más preferible es que para la purificación se emplee cromatografía líquida de alto rendimiento ("HPLC").

45 Se conocen muchos sistemas de expresión, incluyendo los sistemas que emplean: bacterias (por ejemplo, *E. coli* y *Bacillus subtilis*) transformadas, por ejemplo, con vectores de expresión de ADN de bacteriófagos recombinantes, plásmidos o cósmidos; levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*) transformadas, por ejemplo, con vectores de expresión de levadura; sistemas celulares de insecto transformados, por ejemplo, con vectores de expresión viral (por ejemplo, baculovirus); sistemas celulares vegetales transformados, por ejemplo, con vectores de

expresión viral o bacteriana; sistemas celulares animales transformados, por ejemplo, con vectores de expresión de adenovirus.

5 Las secuencias de aminoácidos adecuadas para su uso como un patrón interno peptídico marcado por masa pueden determinarse prediciendo productos de fragmentación de una proteína en función de la especificidad de la proteína y de la secuencia de aminoácidos de la proteína analito usando métodos *in silico* muy conocidos por los expertos en la técnica. La secuencia o las secuencias de aminoácidos adecuadas para su uso como precursores del patrón interno peptídico también se pueden determinar mediante la fragmentación y análisis espectrométrico de masas de la proteína analito, y se determina la estructura primaria real de los fragmentos de péptido generados.

10 La proteína analito puede ser cualquier proteína conocida o una proteína hipotética predicha por el análisis de secuencias de ácido nucleico de una vacuna.

15 El péptido firma marcado por masa puede ser diseñado para detectar y medir los péptidos y las proteínas modificados, incluyendo las modificaciones, sin limitación, fosforilación, glicosilación, oxidación, farnesilación, acetilación, ubiquinación, lipidación, prenilación y sulfonación. También pueden estar diseñados para detectar y medir especies de péptidos y proteínas conocidas o predichas generadas por corte y empalme alternativo del ARNm, por degradación específica o inespecífica de la proteína *in vivo* o por variación debida a polimorfismos de un solo nucleótido.

20 Puede diseñarse y sintetizarse un solo péptido firma para generar uno, dos o más péptidos firma tras la fragmentación. Por ende, una realización adicional de este aspecto de la invención es cuando un péptido firma marcado por masa comprende más de un péptido firma marcado por masa. Una realización adicional de este aspecto de la invención es cuando un péptido firma marcado por masa comprende patrones internos peptídicos marcados por masa para el análisis de fragmentos peptídicos que se originan en múltiples proteínas analito.

Una muestra heterogénea de péptidos o proteínas puede ser extraída de una muestra de vacuna, o derivarse de la fragmentación de una muestra heterogénea de péptidos y proteínas extraída de una muestra de vacuna. Los métodos de extracción de proteínas de tales muestras de vacunas son muy conocidos para los expertos en la materia.

25 El péptido firma marcado por masa, útil en este aspecto de la divulgación, puede tener cualquier longitud que sea adecuada para el método de la divulgación y normalmente tiene una longitud de entre 4 y 50 aminoácidos, preferiblemente una longitud de entre 10 y 40 aminoácidos. El tamaño del péptido firma marcado por masa está dictado por el requisito de que el péptido firma tenga un tamaño mínimo tal que se pueda relacionar con la proteína o péptido analito y un tamaño máximo tal que el péptido del patrón pueda ser resuelto utilizando métodos existentes de espectrometría de masas.

30 Un aspecto adicional de este aspecto de la divulgación es aquel en el que el precursor del patrón interno peptídico marcado por masa tiene una longitud de entre 6 y 200 aminoácidos. Como se mencionó anteriormente, el precursor del péptido firma puede contener una o varias secuencias de aminoácidos que corresponden a secuencias en una o varias proteínas conocidas o predichas.

35 Un aspecto adicional de este aspecto de la divulgación es aquel en el que el péptido firma marcado por masa se purifica conjuntamente con la proteína analito o las proteínas analito para ser medido durante las etapas de preparación de la muestra realizadas antes de su exposición a la fragmentación enzimática o química.

40 El péptido firma cambiado en masa es añadido a la muestra que ha de ser analizada, opcionalmente antes de cualquier etapa de preparación de la muestra o de fraccionamiento. Se pueden añadir varios péptidos firma diferentes para permitir la cuantificación de múltiples proteínas y péptidos diferentes simultáneamente, y se pueden añadir varios precursores del patrón interno para diferentes fragmentos de la misma proteína para obtener información redundante. Alternativamente, se puede usar un único precursor del patrón interno que genere más de un patrón interno.

45 La muestra puede ser preparada, si se requiere, para el análisis eliminando sustancias que puedan interferir en el análisis y enriquecer el o los analitos. Los métodos que pueden usarse incluyen la extracción en fase sólida, la cromatografía líquida, precipitación, ultrafiltración y purificación utilizando técnicas basadas en la afinidad, como apreciarán los expertos en la técnica.

Las proteínas de la muestra también pueden ser modificadas químicamente; por ejemplo, por reducción y carboximetilación de cisteínas para romper puentes disulfuro y evitar la formación de dímeros de péptido.

50 El método de la invención comprende la etapa de fragmentar la muestra heterogénea de proteínas o péptidos para producir una muestra heterogénea de fragmentos de péptido. A continuación, estos fragmentos pueden ser identificados y analizados usando métodos y procesos asociados con la espectrometría de masas de monitorización de reacción múltiple, divulgadas con mayor detalle posteriormente.

55 La etapa de fragmentación de la muestra heterogénea de proteínas, polipéptidos o péptidos se puede lograr mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, se puede usar fragmentación química o enzimática. En la técnica se conocen numerosos métodos de fragmentación química o enzimática (es decir, dirigidos por proteasa). Por ejemplo, las proteasas incluyen tripsina, quimotripsina, pepsina, trombina, papaína, bromelina, termolisina, subtilisina,

factor Xa, proteasa de *Staphylococcus aureus* y carboxipeptidasa A. En una realización preferida, el método de fragmentación escindiría proteínas, polipéptidos o polipéptidos en lugares definidos. La fragmentación enzimática está normalmente dirigida a secuencias, como se muestra a continuación. Por ende, una realización adicional de este aspecto de la invención es aquella en la que la fragmentación enzimática o química está dirigida a secuencias.

<u>Enzima:</u>	<u>Sitio preferido de fragmentación</u>
tripsina:	R1 = Lys, Arg
quimotripsina:	R1 = Tyr, Phe, Leu, Ile, Val, Trp e His a pH elevado
pepsina:	R1 = Phe, Leu, muchos otros
trombina:	R1 = Arg
papaína:	R1 = Arg, Lys, Phe-X (lado CO del resto junto a Phe)
bromelina:	R1 = Lys, Ala, Tyr, Gly
proteasa de <i>Staphylococcus aureus</i> :	R1 = Glu, Asp
factor Xa:	R1 = Ile-Glu-Gly-Arg
termolisina:	R2 = Tyr, Phe, Leu, Ile, Val, Trp and His

5 definiéndose R1 y R2 según la siguiente fórmula:



Los métodos de fragmentación química también pueden ser dirigidos a secuencias; por ejemplo, la fragmentación por bromuro de cianógeno, que escindiría una proteína o péptido en el lado C-terminal de la metionina.

10 Así, por ejemplo, la fragmentación con tripsina es un medio de fragmentación dirigido a una secuencia, dado que la fragmentación está dirigida por la presencia de restos de arginina o lisina en una proteína, un polipéptido o un péptido, y, en consecuencia, produce fragmentos de fragmentación que tienen, como su resto C-terminal, ya sea una arginina o una lisina.

15 Una realización adicional de este aspecto de esta invención es aquella en la que el precursor del patrón interno peptídico marcado por masa y la muestra que comprende una o múltiples proteínas analito son separadas después de la fragmentación enzimática o química.

20 La fragmentación de una población heterogéneas de proteínas dando lugar a péptidos producirá habitualmente una mezcla muy compleja de péptidos que requiere la separación previa al análisis espectrométrico de masas para reducir la complejidad. Los métodos que pueden usarse para la separación de péptidos incluyen cromatografía líquida (en una o más dimensiones de separación), extracción en fase sólida y captura por afinidad, como apreciará un experto en la técnica.

25 La separación se puede asociar al análisis espectrométrico de masas en línea (cromatografía líquida asociada a la espectrometría de masas por electropulverización) o mediante fraccionamiento seguido del análisis de la fracción individual mediante, por ejemplo, espectrometría de masas de desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI). La diferencia en la abundancia entre el péptido analito y el péptido del patrón interno marcado por masa puede ser medida mediante espectrometría de masas de una sola fase (MS) o MS de múltiples fases (MS/MS o MSⁿ). En un análisis espectrométrico de masas de dos fases, la primera separación de masas es usada para seleccionar los péptidos que han de ser analizados; a continuación, los péptidos seleccionados se fragmentan y los fragmentos se analizan en la separación de masas de la segunda fase.

30 La MS/MS es un planteamiento muy potente para analizar mezclas complejas de péptidos, ya que tiene el potencial de resolver péptidos con una masa molecular idéntica pero con una composición de aminoácidos diferente.

35 La intensidad de la señal obtenida de un péptido específico por espectrometría de masas depende de la concentración, del peso molecular y de las características de ionización del péptido, así como de los efectos de extinción de otros componentes de la muestra. Para dos péptidos que son idénticos, salvo, por ejemplo, en la composición isotópica, la intensidad de señal relativa debería depender idealmente solo de las concentraciones, ya que todos los demás factores deberían afectarlos por igual.

Otro método para separar los péptidos es la "Captura de péptidos firma" (SPC) como se expone en el documento PCT/EP2004/002566.

40 Un aspecto adicional de la invención proporciona un conjunto de partes que comprende un péptido firma marcado por masa definido anteriormente o en relación con el primer aspecto de la invención y un agente para fragmentar los péptidos.

Un aspecto adicional de la invención proporciona un conjunto de partes que comprende un péptido firma marcado por masa definido anteriormente o en relación con el primer aspecto de la invención y una muestra de ensayo que contiene

o en la que debe buscarse (por ejemplo, en la que se cree que contiene) la proteína o péptido analito. El conjunto puede comprender, además, un agente para fragmentar los péptidos.

Espectrometría de masas

5 La espectrometría de masas puede ser usada para mostrar los espectros de las masas de las moléculas que comprenden la muestra, incluyendo la masa de péptidos diana distintivos. La espectrometría de masas también se puede denominar espectroscopia de masas. La espectrometría de masas incluye las siguientes etapas:

- a. ionizar la muestra que incluye los péptidos firma añadidos a la proteína viral;
- 10 b. separar los iones generados según su razón de masa a carga;
- c. detectar dinámicamente los iones detectando la energía de las partículas cargadas; y
- d. procesar la señal o la pluralidad de señales resultantes formando espectros de las pasas de las partículas de la muestra.

15 En "An Introduction to Mass Spectrometry" (1997), Van Bramer, Widener University, Department of Chemistry, se muestran sistemas y dispositivos capaces de llevar a cabo el análisis de espectros de masas. Las realizaciones divulgadas emplean la espectrometría de masas con monitorización de reacción múltiple (MRM) para potenciar al proceso de detección. A diferencia de la espectrometría de masas tradicional, la MRM es muy selectiva y dirigida. Esta característica permite que un instrumento se regule con precisión para buscar específicamente fragmentos de proteínas de interés. Así, las realizaciones divulgadas proporcionan un análisis selectivo de proteínas de interés, no grandes cantidades de datos generados a partir del análisis espectral de masas habitual.

20 La cuantificación de la presencia de una o más proteínas virales de la muestra se puede detectar de manera diferencial mediante las realizaciones divulgadas usando la monitorización de reacción múltiple. Se pueden identificar los fragmentos de las proteínas y luego se realiza un proceso de "filtrado" para cuantificar las proteínas de interés. De acuerdo con estas realizaciones, se puede usar un espectrómetro de masas de triple cuadrúpolo para la medición cuantitativa de proteínas diana. Por ejemplo, el proceso MRM puede usar al menos dos fases de filtrado por masa para examinar selectivamente la fragmentación de iones particulares relacionados con las proteínas virales. En una fase, se preselecciona un ion de interés (el precursor) y se lo induce a fragmentarse en una célula de colisión. En una segunda etapa, se analiza la masa de un pequeño número de iones, o iones de transición, de fragmentos específicos a una secuencia. Así, las realizaciones divulgadas pueden usar MRM para determinar la cantidad de proteína viral en la muestra de preparación de vacuna comparando los resultados de los análisis de MRM con los patrones.

25 "Quantitative, Multiplexed Assays for Low Abundance Proteins in Plasma by Targeted Mass Spectrometry and Stable Isotope Dilution", Keshishian *et al.*, Mol Cell Proteomics 6:2212-29 (2007), divulga el sistema y el proceso usados por la espectrometría de masas MRM. Otras realizaciones pueden ser usadas con la función de filtrado de los iones generados por el proceso MRM de acuerdo con su masa, y para proporcionar un análisis espectral de estos iones.

30 Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar aspectos preferidos de la divulgación. Los expertos en la técnica deberían apreciar que las técnicas dadas a conocer en los ejemplos que siguen representan técnicas que los inventores han descubierto que funcionan bien en la práctica de la invención, y, así, se puede considerar que constituyen modos preferidos para su práctica. Sin embargo, los expertos en la técnica, en vista de la presente divulgación, deberían apreciar que pueden realizarse muchos cambios en las realizaciones específicas que se describen y seguir obteniendo un resultado parecido o similar sin apartarse del espíritu y el alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Desarrollo de un ensayo para determinar cuantitativamente la concentración del ORF2 de PCV en una composición de vacuna

45 Los inventores desarrollaron con éxito un ensayo para medir cuantitativamente la proteína del ORF2 en una matriz compleja. Monitorizando transiciones de monitorización de reacción múltiple (MRM) de dos péptidos trípticos distintivos de esta proteína del ORF2 —NVDHVGLGTAFENSK (SEC ID N° 4) y VEFWPCSPITQGDR (SEC ID N° 24)—, los inventores pudieron construir curvas lineales patrón en el intervalo de 3,125 µg/mL tao 200 µg/mL, con un coeficiente de varianza (CV) inferior al 10% para todos los puntos, salvo uno, en la curva patrón, incluyendo tanto la totalidad del procesamiento de las muestras como el desempeño de los equipos analíticos. Este intervalo de concentración fue fijado antes de la realización de las mediciones en previsión del intervalo dinámico necesario; sin embargo, la razón señal-ruido es suficiente para extender, si es necesario, el límite inferior de cuantificación (LLOQ) a concentraciones más bajas en trabajos futuros. La concentración determinada para le muestra de vacuna 230-61A (el número de lote de la muestra de ensayo descrita posteriormente) es de aproximadamente 4 µg/mL.

55 Se generaron curvas de series de disoluciones para 2 conjuntos de vacuna (conjunto 1: muestras 261-007B-1, 261-007C-1, 261-007D-1 y 261-007F-1; conjunto 2: 261-007B, 261-007C, 261-007D y 261-007F). La medición por MRM pudo distinguir la ligera variación en concentración dentro de cada conjunto de vacuna.

Materiales

Las siguientes muestras fueron suministradas por Boehringer Ingelheim Vetmedica. Fueron divididas en partes alícuotas (50 µL/ampolla) y luego mantenidas en un congelador a -80°C antes de su procesamiento.

5 Muestra 1: 230-61A (La muestra diana comprende MYCOFLEX® y MYCOFLEX®. El caldo incluye un 10% de suero porcino).

Muestra 2: 230-61B (Un control positivo. También contiene la proteína del ORF2).

10 Muestra 3: 230-61C (Una matriz de segundo plano de 230-61B. No contiene ORF2).

Muestra 4: 230-61D (ORF2 purificado en tampón de PBS).

Muestra 5: 230-64E (Una matriz de segundo plano de 230-61A.)

15 Muestra 6: 230-64F (*Mycoplasma hyopneumoniae*. El caldo incluye un 10% de suero porcino).

Además, se proporcionó una muestra purificada de ORF2 a 1 mg/mL para generar una curva patrón.

Se adquirieron, en una cantidad de 5×1 nmol, en AnaSpec (Fremont, California) tres péptidos sintéticos marcados con isótopos estables (identificados como péptidos "AQUA") que representaban las tres secuencias trípticas del ORF2. Los tres péptidos son:

20 a. NVDHVGLGTAFENS[KC¹³N¹⁵] (SEC ID N° 4),

b. ISIPFEYY[RC¹³N¹⁵] (SEC ID N° 26), y

c. VEFWPCSPITQGD[RC¹³N¹⁵] (SEC ID N° 24).

25 La marca isotópica estaba en el aminoácido C-terminal. La marca en la lisina produce un cambio de masa de 8 Da, y la marca en la arginina produce un cambio de masa de 10 Da. Además de los tres péptidos AQUA, se sintetizó un péptido más largo que contenía la secuencia de ISIPFEYYR (SEC ID N° 26) para determinar la eficacia de la digestión tríptica. Este péptido es GGGTNK[IC¹³N¹⁵]S[IC¹³N¹⁵]PFEYYRIRKVKVEF (SEC ID N° 28). Las marcas en dos isoleucinas producen un cambio de masa de 14 Da.

30 Se adquirió detergente RapiGest en Waters (Milford, Massachusetts).

Métodos**Preparación de muestras para la curva patrón**

35 Se marcó el ORF2 (1 mg/mL) dentro de la matriz de segundo plano de la vacuna "muestra 5, 230-64E" a una concentración final de 200 µg/mL. Usando esta solución madre, se creó una serie de diluciones añadiendo la "muestra 5, 230-64E" para generar las siguientes concentraciones predeterminadas de ORF2: 100, 50, 25, 12,5, 6,25 y 3,125 µg/mL. Además, se crearon otras tres concentraciones —64, 32 y 16 µg/mL— con fines de validación.

Digestión tríptica de muestras de curva patrón y vacuna

40 Típicamente, se diluyeron 20 µL de muestra con 80 µL de solución de la mezcla maestra que contenía 50 mM de NH₄HCO₃, 0,1% de RapiGest, 250 fmol/µL de péptidos AQUA con aminoácido marcado con un isótopo estable. Los cuatro péptidos AQUA son NVDHVGLGTAFENS[KC¹³N¹⁵] (SEC ID N° 4), ISIPFEYY[RC¹³N¹⁵] (SEC ID N° 4), VEFWPCSPITQGD[RC¹³N¹⁵] (SEC ID N° 24) y GGGTNK[IC¹³N¹⁵]S[IC¹³N¹⁵]PFEYYRIRKVKVEF (SEC ID N° 28). En el caso de una muestra testigo doble, los péptidos AQUA no fueron incluidos en la mezcla maestra.

45 Posteriormente, las proteínas fueron desnaturalizadas, reducidas y alquiladas antes de ser digeridas por 8 µg de tripsina a 37°C durante 16 horas. Por último, esta solución que contenía los péptidos trípticos de ORF2 y péptidos AQUA fue acidificada para descomponer el detergente RapiGest y fue analizada mediante LC-MRM en un instrumento de triple cuadrípulo 4000 Qtrap (ABI/Sciex).

Cromatografía líquida-MRM (LC-MRM)

50 Se acopló directamente un sistema de HPLC Agilent serie 1100 capilar binario a un espectrómetro de masas ABI 4000 Qtrap. Se usó una columna de cromatografía capilar de fase inversa (partículas de sílice C18 de 5 µm, dimensión de la columna 320 µm × 15 cm, Micro-Tech Scientific, Vista, California) a un caudal de 8 µL / min. El volumen de inyección fue de 10 µL para todas las tandas usando el inyector automático HTC PAL de Leap Technologies (Carrboro, Carolina del Norte). La elución en gradiente de los péptidos trípticos se logró usando un gradiente de 0% a 45% de disolvente B durante 52 minutos (el disolvente A es ácido fórmico al 0,1% en H₂O y el disolvente B es ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo). Las condiciones de MRM se determinaron mediante la infusión de los péptidos AQUA y aumentando el

potencial de desagregación (DP) y la energía de colisión (CE) para maximizar las intensidades iónicas de los fragmentos. Las condiciones finales se enumeran en la Tabla 1. El tiempo de permanencia para cada transición se estableció en 50 ms y el tiempo total del ciclo Qtrap fue de 0,77 segundos.

Q1	Q3	Tiempo de permanencia (mseg)	Péptido	DP	CE
794,4	1023,5	50	NVDHVGLGTAFENSK	100	42
794,4	853,4	50	NVDHVGLGTAFENSK	100	40
798,4	1031,5	50	NVDHVGLGTAFENSK*	100	42
798,4	861,4	50	NVDHVGLGTAFENSK*	100	40
594,3	874,4	50	ISIPFEYYR	70	25
594,3	987,5	50	ISIPFEYYR	70	24
599,3	884,4	50	ISIPFEYYR*	70	25
599,3	997,5	50	ISIPFEYYR*	70	24
601,3	874,4	50	I*SI*PFEYYR	70	25
601,3	994,5	50	I*SI*PFEYYR	70	24
846,9	1131,5	50	VEFWPC(carboximetil)SPITQGDR	80	37
846,9	786,4	50	VEFWPC(carboximetil)SPITQGDR	80	40
851,9	1141,5	50	VEFWPC(carboximetil)SPITQGDR*	80	37
851,9	796,5	50	VEFWPC(carboximetil)SPITQGDR*	80	40

- 5 **Tabla 1: Condiciones de MRM para los tres péptidos trípticos del ORF2 y sus correspondientes péptidos AQUA.** K* es lisina marcada con C¹³N¹⁵, R* arginina marcada con C¹³N¹⁵, e I* es isoleucina marcada con C¹³N¹⁵. El incremento de masa para el aminoácido marcado es 8 Da, 10 Da y 7 Da, respectivamente.

Curvas patrón de calibración, validación y determinación de las concentraciones de ORF2 en una vacuna

- 10 Se generaron curvas patrón de calibración con el ORF2 marcado dentro de la “muestra 5, 230-64E” a las concentraciones finales predeterminadas de 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50, 100 y 200 µg/ml. Los péptidos AQUA (200 fmol/µL) se añadieron a la solución de elución para que cada punto de concentración sirviera como patrones internos. Las respuestas del área de pico registradas para la transición se integraron utilizando el soporte lógico ABI MultiQuant (versión 1.0, AB SCIEX, 500 Old Connecticut Path, Framingham, Massachusetts 01701, EE. UU.). Los parámetros de integración para todos los péptidos se establecieron como sigue: anchura total de aplanamiento, 3 puntos; ventana de TA, 120 seg; anchura mínima de pico, 3 puntos; altura mínima de pico, 0 cps; porcentaje de ruido, 40%; ventana de resta de la línea de referencia, 2 min; factor de división del pico, 2 puntos. Las razones del área integrada del pico (eje y) del péptido ORF2 al péptido AQUA se representaron en función de la concentración del ORF2 (eje x) y se derivaron curvas patrón de ajuste lineal ($y=mx+b$). Las concentraciones de la vacuna de ORF2 y las muestras de validación a 64, 32 y 16 µg/ml se calcularon usando la curva patrón.

20 Curvas de series de disolución de vacuna

Las vacunas 261-007B-1, 261-007C-1, 261-007D-1, 261-007F-1 se diluyeron 2, 4, 8, 16 y 32 veces usando la muestra 230-64E. Las vacunas 261-007B, 261-007C, 261-007D, 261-007F se diluyeron 2, 4, 8, 16 y 32 veces usando la muestra 230-61C. Las muestras diluidas y las no diluidas fueron procesadas y analizadas usando el mismo protocolo que ha sido descrito anteriormente.

25 Resultados

Selección de péptidos trípticos para la monitorización por MRM

- 30 La digestión tríptica de la proteína ORF2 purificada se analizó en un espectrómetro de masas Orbitrap para la identificación de péptidos. Se seleccionaron tres secuencias trípticas para la síntesis de péptidos AQUA, así como monitorización por MRM debido a sus características de señal intensa y relativamente limpias. Cada péptido fue monitorizado en dos transiciones de iones y (véase la **Tabla 1**). Además, se sintetizó una versión extendida (GGGTNK[IC¹³N¹⁵]S[IC¹³N¹⁵]PFEYYRIRKVKVEF) (SEC ID N° 28) del péptido ISIPFEYYR (SEC ID N° 26). Este péptido contenía dos sitios de fragmentación tríptica. Se calculó la relación de señal del péptido marcado con isótopos estables [IC¹³N¹⁵]S[IC¹³N¹⁵]PFEYYR (SEC ID N° 4) con respecto al péptido ISIPFEYYR[RC¹³N¹⁵] (SEC ID N° 4) para estimar la eficiencia de la digestión. En la sección de resultados, solo se analizarán los datos relacionados con los péptidos NVDHVGLGTAFENSK (ID SEC N° 4) y VEFWPCSPITQGDR (ID SEC N° 24). El Péptido ISIPFEYYR (ID SEC N° 26) se expone en la sección de Exposición.

Curvas patrón

Se generaron cuatro curvas patrón para las transiciones 794,4/1023,5, 794,4/853,4, 846,9/1131,5 y 846,9/786,4 para los péptidos NVDHVGLGLTAFENSK (SEC ID N° 4) y VEFWPCSPITQGDR (ID SEC N° 24), respectivamente. No se ponderó ningún punto de datos. Se aplicó un ajuste lineal simple a todos los puntos de datos. El R cuadrado para cada curva estaba por encima de 0,99. Los coeficientes de varianza (CV) para las tres muestras repetidas (incluidos todas las etapas de procesamiento) varían del 1% al 12%, estando la mayoría de los datos por debajo del 10%. La **Figura 1** muestra la integración para la transición en 794,4/1023,5 y 794,4/853,4 a partir de un conjunto de puntos de datos. Véase la **Figura 2** para las curvas patrón, la **Tabla 2** para las relaciones promedio y los CV calculados, y la **Tabla 3** para el porcentaje calculado de errores.

10 (a)

Concentración (ug/mL)	T1 promedio (794,4/1023,5)	Desviación típica de T1	Coefficiente de varianza de T1 (%)	T2 promedio (794,4/853,4)	Desviación típica de T2	Coefficiente de varianza de T2 (%)
3,125	0,36	0,02	6	0,38	0,05	12
6,25	0,72	0,03	5	0,78	0,04	5
12,5	1,54	0,11	7	1,71	0,06	4
25	3,21	0,03	1	3,52	0,26	7
50	6,19	0,30	5	6,66	0,21	3
100	11,79	0,75	6	11,88	0,43	4
200	25,18	1,86	7	24,97	2,18	9

(b)

Concentración (ug/mL)	Razón_T1 promedio (846,9/1131,5)	Desviación típica de T1	Coefficiente de varianza de T1 (%)	Razón_T2 promedio (846,9/786,4)	Desviación típica de T2	Coefficiente de varianza de T2 (%)
3,125	0,07	0,00	5	0,06	0,00	6
6,25	0,15	0,01	5	0,13	0,01	4
12,5	0,30	0,01	3	0,26	0,00	1
25	0,64	0,01	1	0,56	0,02	4
50	1,19	0,01	1	1,08	0,03	3
100	2,33	0,05	2	2,11	0,06	3
200	4,82	0,11	2	4,30	0,11	3

15 **Tabla 2: Razones promedio con respecto a la intensidad de péptidos AQUA marcados y CV para las curvas patrón.** (a) Datos para el péptido NVDHVGLGLTAFENSK (SEC ID N° 4); (b) datos para el péptido VEFWPCSPITQGDR (SEC ID N° 24).

Usando las curvas patrón deducidas, se calculó el porcentaje de error para cada punto de concentración (Tabla 3). Salvo por la concentración mínima del péptido NVDHVGLGLTAFENSK (SEC ID N° 4), los valores absolutos del porcentaje de error varían del 1% al 22%, estando la mayoría de los datos por debajo del 15%.

20

(a)

Concentración (mg/mL)	% de error del conjunto 1 de T1	% de error del conjunto 1 de T2	% de error del conjunto 2 de T1	% de error del conjunto 2 de T2	% de error del conjunto 3 de T1	% de error del conjunto 3 de T2
3,125	20	-24	12	-49	9	-39
6,25	8	-13	2	-22	0	-13
12,5	8	6	9	-1	-4	0
25	6	17	5	0	4	13
50	-5	9	4	7	3	2
100	-8	-3	-9	-9	2	-2
200	7	-2	3	11	-7	-7

(b)

Concentración (mg/mL)	% de error del conjunto 1 de T1	% de error del conjunto 1 de T2	% de error del conjunto 2 de T1	% de error del conjunto 2 de T2	% de error del conjunto 3 de T1	% de error del conjunto 3 de T2
3,125	0	-2	-8	-13	-6	-9
6,25	5	2	-5	2	-2	-5
12,5	5	-1	1	-1	0	-3
25	8	8	5	0	7	6
50	-1	-1	-1	0	0	4
100	-2	-2	-5	-4	-1	1
200	2	0	2	3	-2	-2

5 **Tabla 3: Porcentaje of error para cada punto de concentrado usado en la curva patrón.** (a) Datos para el péptido NVDHVGLGTAFENSK (SEC ID N° 4); (b) datos para el péptido VEFWPCSPITQGDR (SEC ID N° 24).

Validación de las curvas patrón

Se usaron tres soluciones de QC [control de calidad] con concentraciones de ORF2 a 16 µg/mL, 32 µg/mL y 64 µg/mL para validar la curva. Cada punto de concentración fue procesado y analizado independientemente tres veces. Los CV para los datos fueron inferiores al 8%. Los valores absolutos del porcentaje de error varían del 1% al 12%, estando la mayoría de los datos por debajo del 10% (Tabla 4).

(a)

Nombre de la muestra	Razón_ T1 (794,4 /1023,5)	Razón_ T2 (794,4 /853,4)	Concentración_ T1 calculada de la muestra(ug/mL)	Concentración_ T2 calculada de la muestra (ug/mL)	T1 promedio (ug/mL)	T2 promedio (ug/mL)	Desviación típica de T1	Desviación típica de T2	CV-T1	CV-T2	% de error de T1	% de error de T2
I1_64	8,07	8,16	65,24	65,08	64,23	67,42	2,50	2,06	4	3	2	2
I2_64	7,59	8,55	61,39	68,20							-4	7
I3_64	8,17	8,64	66,07	68,97							3	8
J1_32	4,26	4,12	34,76	32,31	33,43	29,87	2,40	2,19	7	7	9	1
J2_32	4,27	3,60	34,86	28,09							9	-12
J3_32	3,74	3,74	30,66	29,19							-4	-9

Nombre de la muestra	Razón_T1 (794,4 /1023,5)	Razón_T2 (794,4 /853,4)	Concentración_T1 calculada de la muestra(ug/mL)	Concentración_T2 calculada de la muestra (ug/mL)	T1 promedio (ug/mL)	T2 promedio (ug/mL)	Desviación típica de T1	Desviación típica de T2	CV-T1	CV-T2	% de error de T1	% de error de T2
K1_16	1,93	2,13	16,14	16,20	16,51	15,53	0,50	0,61	3	4	0	0
K2_16	1,95	2,03	16,32	15,38							0	-1
K3_16	2,05	1,99	17,08	15,00							2	-2

(b)

Nombre de la muestra	Razón_T1 (846,9 /1131,5)	Razón_T2 (846,9 /786,4)	Concentración_T1 calculada de la muestra(ug/mL)	Concentración_T2 calculada de la muestra (ug/mL)	T1 promedio (ug/mL)	T2 promedio (ug/mL)	Desviación típica de T1	Desviación típica de T2	CV-T1	CV-T2	% de error de T1	% de error de T2
I1_64	1,53	1,35	63,66	63,06	64,86	63,84	1,05	0,84	2	1	-1	-1
I2_64	1,57	1,36	65,35	63,74							2	0
I3_64	1,57	1,39	65,57	64,72							2	1
J1_32	0,81	0,73	34,02	33,94	31,97	31,59	1,90	2,49	6	8	6	6
J2_32	0,76	0,68	31,65	31,85							-1	0
J3_32	0,72	0,62	30,25	28,99							-5	-9
K1_16	0,39	0,35	16,50	16,30	16,54	16,45	0,63	0,78	4	5	1	0
K2_16	0,38	0,34	15,93	15,76							0	0
K3_16	0,41	0,37	17,18	17,29							2	2

5 **Tabla 4: Porcentaje de error para la validación de las muestras de QC.** (a) Datos deducidos de las curvas patrón del péptido NVDHVGLGTAFENSK (SEC ID N° 4); (b) datos deducidos de las curvas patrón del péptido VEFWPCSPITQGDR (SEC ID N° 24).

Concentración de ORF2 en la vacuna 230-61A

10 La muestra de la vacuna 230-61A fue procesada y analizada independientemente tres veces. La concentración de ORF2 se determinó utilizando las curvas patrón deducidas de los péptidos NVDHVGLGTAFENSK (ID SEC N° 4) y VEFWPCSPITQGDR (SEC ID N° 24). En la **Tabla 5** se muestran Los valores absolutos y el CV.

(a)

Muestra	Razón_T1 (794,4/1023,5)	Razón_T2 (794,4/853,4)	Muestra Conc_T1 (ug/mL)	Muestra Conc_T2 (ug/mL)	T1 promedio (ug/mL)	T2 promedio (ug/mL)	Desviación típica de T1	Desviación típica de T2	CV-T1	CV-T2
L1	0,9502	0,9502	8,31	6,60	8,45	6,49	0,36	0,21	4	3
L2	1,0188	0,9068	8,86	6,25						
L3	0,9356	0,9516	8,19	6,61						

(b)

Muestra	Razón_T1(846,9/1131,5)	Razón_T2(846,9/786,4)	Muestra Conc_T1(ug/mL)	Muestra Conc_T2 (ug/mL)	T1 promedio (ug/mL)	T2 promedio (ug/mL)	Desviación típica de T1	Desviación típica de T2	CV-T1	CV-T2
L1	0,0971	0,0864	4,15	4,00	4,17	4,17	0,15	0,17	4	4
L2	0,0946	0,0899	4,04	4,16						
L3	0,1016	0,0938	4,33	4,35						

Tabla 5: Concentración de proteína ORF2 en la vacuna 230-61A. (a) Datos deducidos de las curvas patrón del péptido NVDHVGLGTAFENSK (SEC ID N° 4); (b) datos deducidos de las curvas patrón del péptido VEFWPCSPITQGDR (SEC ID N° 24).

Testigo y testigo doble

Se prepararon para el estudio muestras (230-64E) testigo (sin ningún ORF2, pero con péptidos AQUA añadidos) y testigo doble (también sin péptidos AQUA). Las trazas testigo y testigo doble se compararon con el punto más bajo de la curva patrón a una concentración de 3,125 µg/mL. (No se muestran las transiciones de los cromatogramas del péptido NVDHVGLGTAFENSK (SEC ID N° 4) y VEFWPCSPITQGDR (SEC ID N° 24). Hay menos del 1% de interferencias para las transiciones monitorizadas.

Curvas de series de disoluciones de la vacuna

Usando la muestra 230-64E, las series de vacuna 261-007B-1, 261-007C-1, 261-007D-1, y 261-007F-1 fueron diluidas 2, 4, 8, 16 y 32 veces. Las series de vacuna 261-007B, 261-007C, 261-007D y 261-007F fueron diluidas utilizando la muestra 230-61C 2, 4, 8, 16 y 32 veces. Cada punto de concentración fue procesado individualmente. No se muestran los cromatogramas de MRM seleccionados por masa extraídos para la vacuna 231-007B-1 y la vacuna 231-007B. Se realizó un gráfico de la relación del área pico del péptido del ORF2 endógeno con respecto al área pico del péptido AQUA frente a la concentración relativa (definiéndose como 1 la concentración inicial) para la serie 261-007-1, péptido NVDHVGLGTAFENSK (SEC ID N° 4); serie 261-007-1, péptido VEFWPCSPITQGDR (SEC ID N° 24); serie 261-007, péptido NVDHVGLGTAFENSK (SEC ID N° 4); y serie 261-007, péptido VEFWPCSPITQGDR (ID SEC N° 24).

En función de los datos ELISA obtenidos previamente, la concentración de ORF2 varía ligeramente dentro de cada conjunto de vacuna, teniendo F la concentración más alta de ORF2 y teniendo B la concentración más baja de ORF2. Los resultados de MRM son coherentes con los datos ELISA.

Exposición

Péptido ISIPFEYYR (SEC ID N° 26)

El péptido ISIPFEYYR (ID SEC N° 26) tuvo la señal más intensa entre los tres péptidos elegidos para cuantificar la concentración de ORF2. Sin embargo, fue abandonado temprano por las siguientes razones. En primer lugar, su curva patrón es significativamente no lineal, mostrando una tendencia de saturación. En segundo lugar, la serie de disoluciones de la vacuna mostró una tendencia anormal, como que el punto de dilución de ½ tenía una razón más alta que la vacuna sin diluir. Este comportamiento indicaba alguna interacción del péptido con una proteína de suero porcino.

Eficiencia y coherencia de la digestión

Se sintetizó una versión más larga del péptido ISIPFEYYR (SEC ID N° 26) con isoleucina marcada con isótopos estables incorporada en la secuencia. Su secuencia es (GGGTNK[IC¹³N¹⁵]S[IC¹³N¹⁵]PFEYYRIRKVKVEF) (SEC ID N° 28). Este péptido contenía dos sitios de digestión con tripsina. Después de la digestión completa con tripsina, este péptido más largo se convierte en [IC¹³N¹⁵]S[IC¹³N¹⁵]PFEYYR (SEC ID N° 4). Se calcula la razón de las transiciones MRM de este péptido con respecto a las transiciones MRM del péptido AQUA ISIPFEYY[RC¹³N¹⁵] (SEC ID N° 26) para determinar la eficiencia y la coherencia de la digestión con tripsina. La razón de la serie de curvas patrón (datos no mostrados) mostró que la eficiencia de la digestión es de aproximadamente un 2-2,5% para este péptido largo. La variación para la digestión es inferior al 15% en 42 puntos de datos. Una posible explicación de la baja eficacia de la digestión de este péptido largo es que puede no tener el sitio de unión perfecto para la tripsina. La eficiencia de la digestión con tripsina de la proteína ORF2 intacta puede ser muy diferente y mucho más alta que este péptido.

Compendio

5 Dos de los tres péptidos trípticos que el soporte lógico ABI MultiQuant (versión 1.0) sugirió inicialmente que serían los que con mayor probabilidad resultarían útiles en la presente divulgación se comportaron como se preveía. Sorprendentemente, aunque el péptido ISIPFEYYR (SEC ID N° 26) tenía la señal más intensa entre los tres péptidos escogidos para cuantificar la concentración del ORF2 en los experimentos iniciales, no llegó a tener las características requeridas para el análisis cuantitativo, quizá debido a la interferencia imprevista con una proteína del suero porcino.

Ejemplo 2: Preparación de muestras para MRM**Procedimiento de SEC-MRM para el aislamiento de partículas de tipo viral y digestión con tripsina para el uso en MRM**

- 10 Invertir la columna CHROMA SPIN varias veces para volver a suspender completamente la matriz de gel. Quitar primero el tapón superior y luego el tapón inferior de la columna. Guardar los tapones. Colocar la punta inferior de la columna suavemente (perfectamente, pero no apretada) en uno de los tubos de 2 ml de microcentrifugadora provistos.
- 15 Centrifugar la columna en un rotor de cubeta oscilante o en un rotor de ángulo fijo a 700 × g durante 3 minutos. Desechar el tampón recogido del tubo de 2 ml. Volver a colocar la columna suavemente en el tubo. Añadir 1 ml del PBS al gel.
- Volver a centrifugar a 700 × g durante 3 minutos.
- Vaciar el tubo de recogida de 2 ml y volver a colocar la columna suavemente en el mismo tubo de 2 ml.
- 20 Añadir 1 ml del PBS al gel y volver a centrifugar a 700 × g durante 3 minutos.
- Vaciar el tubo de recogida de 2 ml y volver a colocar la columna suavemente en el mismo tubo de 2 ml. Volver a centrifugar a 700 × g durante 3 minutos para eliminar el PBS restante de la columna.
- Colocar la columna de centrifugado en el segundo tubo de la microcentrifugadora de 2 ml. Con cuidado y lentamente, aplicar una muestra de 70 µL en el centro de la superficie plana del lecho de gel. No permitir que ninguna muestra fluya a lo largo de la pared interna de la columna.
- 25 Centrifugar a 700 × g durante 3 minutos.
- El tubo de la microcentrifugadora contiene varias VLP.
- Transferir 10 µl de las VLP a una placa de 96 pocillos.
- Añadir 100 µl de solución maestra que contiene un 0,1% de RapiGest a cada uno de los pocillos de la placa.
- 30 Añadir 10 µl de DTT 0,1 M y centrifugar brevemente. Sellar la placa con tapas e incubar a 37°C durante 40 minutos.
- Añadir 25 µl de IAA 0,1M. Sellar la placa con tapas e incubar bajo centrifugado constante a temperatura ambiente durante 0,5 horas (mantener en la oscuridad).
- Añadir 15 µl de tripsina con una concentración de 8 µg/ml (0,8 µg/µl en la solución final) y centrifugar brevemente. Sellar la placa con tapas e incubar a 37°C durante 16 horas.
- 35 Añadir 15 µl de HCl (2 M) y centrifugar brevemente. Sellar la placa con tapas e incubar a 37 grados durante 1 hora.
- Filtrar los extractos e inyectar 20 µL en HPLC y monitorizar las transiciones por MRM en AB Sciex 5000.

Método de inmunoprecipitación (IP)

1. Recubrir una placa Immulon 1B de poliestireno de fondo plano de unión de caldo de microtitulación de 96 posiciones agregando 300 µL de tampón de carga en cada pocillo. Incubar a TA [temperatura ambiente] durante 10 minutos. Desechar el tampón de carga y dejar que la placa se seque.
- 40 2. Diluir todas las muestras como se indica aquí. Tomar 10 µL de muestras en tubos Eppendoff loBind. Añadir 490 µL de tampón de carga. Mezclar bien mediante centrifugación.
3. Tomar una parte alícuota de 50 µL de las muestras diluidas en cada pocillo de la placa de 96 posiciones recubierta de antemano.
- 45 4. Añadir 10 µL de anticuerpos policlonales (pAb) (0,7 mg/mL en el tampón de carga) a cada pocillo.
5. Incubar a TA con centrifugadora a velocidad media durante 2 horas.
- 50 6. Añadir 100 µL de perlas de proteína G (6 mg/ml en el tampón de carga) a cada pocillo.
7. Incubar a TA con centrifugadora a velocidad media durante 2 horas.
- 55 8. Lavar con tampón de lavado cuatro veces con centrifugado entre cada lavado.
9. Añadir 25 µL de solución de RapiGest a cada pocillo.
- 60 10. Añadir 10 µL de solución patrón de trabajo (1 µg/mL en bicarbonato amónico 50 mM) a cada pocillo.

11. Añadir 10 µL de DTT 0,1 M a cada pocillo.
12. Incubar a 60°C con centrifugación a una velocidad de 650 RPM durante 1 hora con la Thermomixer.
- 5 13. Añadir 25 µL de IAA 0,1 M a cada pocillo.
14. Incubar a TA en sala amarilla con centrifugadora a velocidad media durante ½ hora.
- 10 15. Añadir 10 µL de solución de tripsina (0,5 mg/mL) a cada pocillo.
16. Incubar a 37°C durante la noche (16 horas) con centrifugadora a velocidad máxima.
17. Añadir 10 µL de HCl 3 M a cada pocillo.
- 15 18. Incubar a 37°C con centrifugadora a velocidad media durante ½ hora.
19. Transferir todas las muestras a una placa de filtro HST multitamiz (la placa de filtro está sujeta con cinta adhesiva con una placa de pocillos cónicos de 96 posiciones de 2,0 mL. Centrifugar a 3000 RPM durante 3 minutos.

20 **Método de inyección automática que usa una plataforma automatizada de tratamiento de muestras de laboratorio para inyectar muestras en una columna de HPLC**

Inyector automático:	CTC Analytics LCPAL
Ciclo	Analyst LC-Inj
Jeringa	100 µL
Volumen de la muestra	5 µL
Volumen de aire	0 µL
Prelimpieza con disolvente 1 ()	0 µL
Prelimpieza con disolvente 2 ()	0 µL
Prelimpieza con la muestra ()	0 µL
Velocidad de llenado	30 µL/s
Carreras de llenado	0
Inyección a	LC Vlv1
Velocidad de inyección	30 µL/s
Demora previa a la inyección	500 ms
Demora posterior a la inyección	500 ms
Disolvente 1 de limpieza de posiciones	1
Disolvente 2 de limpieza de posiciones	1
Disolvente 1 de limpieza de válvulas	1
Disolvente 2 de limpieza de válvulas	1
Recuento de duplicas ()	1
Tiempo de análisis (s)	0
Temperatura del refrigerador:	6

Cromatografía

Bomba de LC:	HP serie 1100 o serie 1200
Columna analítica:	Waters BioSuite C18, producto nº 00D-4439-B0
Temperatura de la columna:	40 °C
Programa de bombeo:	Gradiente
Fase móvil A1:	99:1:0,5 agua / alcohol de isopropanol / ácido fórmico
Fase móvil B1:	70:24:5:1:0,5 acetonitrilo / metanol / agua / alcohol de isopropanol / ácido fórmico
Caudal:	0,3 mL/min

ES 2 734 374 T3

	Bucle del inyector:	20 µL
	Volumen de inyección:	25 µL
	Presión de LC:	4 a 18 MPa
	Lavado 1 del inyector automático:	70:20:5:5 acetonitrilo / metanol / alcohol de isopropanol / agua
5	Lavado 2 del inyector automático:	10:90 acetonitrilo / agua
	Tiempo aproximado de ejecución:	7 minutos

Tabla 1 de etapas del programa analítico de bombeo

Etapa	Tiempo total (min)	Caudal (µL/min)	Composición	
			A (%)	B (%)
0	0	500	92	8
1	1	300	92	8
2	1,1	300	74	26
3	4,5	300	63	37
4	5,0	500	30	70
5	5,5	500	30	70
6	6,0	500	92	8
7	7,0	500	92	8

15
Tabla 2 de etapas del programa de bombeo de relleno:

Etapa	Tiempo total (min)	Caudal (µL/min)	Composición	
			A (%)	B (%)
0	0	200	50	50
1	7	200	50	50

Programa de válvulas

Tiempo total (min)	Posición	Comentarios
Inicial	Izquierda	Carga de muestra/desalificación
1,2	Derecha	Transferir/eluir
5,5	Izquierda	Regeneración

Espectrometría de masas

	Espectrómetro de masas:	LC/MS/MS Sciex API 5000, de triple cuadrípulo
35	Modo de ionización:	Turbo IonSpray
	Gas CAD, CUR, NEB, AUX:	Nitrógeno
	Resolución Q1:	Unidad
40	Resolución Q3:	Unidad
	Energía iónica 1 (1E1)	1
	Energía iónica 3 (1E3)	0,2
	Cuantificación:	Basada en el área del pico
	Calibración:	PPG
	Temperatura de la fuente de iones:	550°C
	Tensión de IonSpray	5000 V
	Multiplicador de electrones (CEM):	2000 V
	Flujo de gas de colisión (CAD):	12

Flujo de gas de cortina (CUR):	20
Flujo de gas del nebulizador (NEB/GS1):	60
Gas Turbo IonSpray (AUX/GS2):	50
Potencial del deflector (DF):	100
Tiempo de pausa:	56,3 ms
Tiempo de obtención:	7 minutos
Modelo de procesamiento:	IntelliQuan

Se usaron los siguientes parámetros para la fuente de ionización por electropulverización: tiempo de permanencia, 50 ms para todas las transiciones de MRM; tensión de pulverización iónica, 5000 V; temperatura de la fuente de iones, 550°C; gas de cortina (CUR), 20. DP: potencial de desagregación. CE: energía de colisión. CXP: potencial de salida de la celda de colisión.

5

Analito	~ t _R (min)	Tiempo de permanencia (ms)	Q1 m/z	Q3 m/z	DP	CE	CXP	EP
VEF	4,0	50	846,9	1131,5	60	38	15	10
IS	4,0	50	851,9	1141,5	60	38	15	10
ISI	3,8	50	594,3	874,4	80	42	15	10
NVD	2,8	50	794,4	1023,5	80	36	15	10

Cromatografía de exclusión por tamaños (SEC)-MRM

El uso de SEC garantiza que solo la VLP o la CLP esté presente en una muestra que ha de ser medida, ya que solo una estructura de VLP o CLP intacta pasará a la fracción vacía. La SEC-MRM permite la separación de la VLP de una matriz compleja con altos niveles de proteínas extrañas irrelevantes. Este método está libre de anticuerpos. Si existe la posibilidad de que un lote de antígeno contenga tanto VLP intacta como VLP degradada, la adición de la etapa SEC garantiza que solo se medirá VLP intacta (es decir, VLP verdadera) en la porción MRM del ensayo.

10

Ejemplo 3: Diferenciación de la cuantificación de PCV2a y PCV2b usando IP-MRM en VLP de ORF2 de PCV2 sin envoltura

PCV2a y PCV2b son subtipos antigénicos de VLP antigénicamente similares, pero no idénticas. De modo similar, los subtipos de VLP del ORF2 de PCV2a y del ORF2 de PCV2b VLP son antigénicamente similares, pero no son idénticos en el ámbito de los aminoácidos. La vacuna deseada de ORF2 de PCV2 contendrá una mezcla de VLP que comprende subtipos tanto de ORF2 de PCV2a como de ORF2 de PCV2b.

15

Normalmente, se usaría un método ELISA para determinar el contenido relativo de antígeno (RAC) o la potencia relativa (RP) de los dos subtipos diferentes de ORF2 de PCV2 en una vacuna. Sin embargo, un ensayo ELISA capaz de diferenciar los niveles de inclusión de PCV2a y PCV2b requeriría dos MAb diferentes (un MAb que reacciona únicamente a PCV2a, y el otro MAb reacciona solo a PCV2b). Sin embargo, la generación de dos MAb distintos que sean capaces de diferenciar entre las dos VLP antigénicamente similares PCV2a y PCV2b sería una tarea muy difícil, probablemente imposible.

20

La IP-MRM permite el uso de anticuerpos policlonales que se unen tanto a PCV2a como a PCV2b, seguido por la diferenciación y la cuantificación subsiguientes de las cantidades de PCV2a y PCV2b por MRM.

25

Listado de secuencias

<110> Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.

30

<120> Cuantificación mejorada de composiciones de vacuna

<130> P10-0154

35

<160> 29

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

40

<211> 233

<212> PRT

<213> Circovirus porcino

ES 2 734 374 T3

<400> 1

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg
1 5 10 15

Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro
20 25 30

Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg
35 40 45

Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Ala Thr Thr Val Thr Thr
50 55 60

Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asp Asp Phe Val
65 70 75 80

Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu Tyr Tyr
85 90 95

Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr
100 105 110

Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn
115 120 125

Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr
130 135 140

Ser Ser Arg His Thr Ile Pro Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr
145 150 155 160

Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro
165 170 175
Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ser Arg Asn
180 185 190

Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Lys Tyr Asp
195 200 205

Gln Asp Tyr Asn Ile Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe
210 215 220

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Glu Pro
225 230

5

<210> 2

<211> 233

<212> PRT

<213> Circovirus porcino

10

<400> 2

ES 2 734 374 T3

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg
1 5 10 15

Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro
20 25 30

Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg
35 40 45

Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Ile Lys Arg Thr Thr Val Arg Thr
50 55 60

Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn Asp Phe Leu
65 70 75 80

Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Arg Ser Val Pro Phe Glu Tyr Tyr
85 90 95

Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr
100 105 110

Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Ser Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn
115 120 125

Phe Val Pro Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr
130 135 140

Ser Ser Arg His Thr Ile Thr Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr
145 150 155 160

Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Gly Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro
165 170 175

Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ala Gly Asn
180 185 190

Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Ile Tyr Asp
195 200 205

Gln Glu Tyr Asn Ile Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe
210 215 220

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Asn Pro
225 230

5 <210> 3
<211> 234
<212> PRT
<213> Circovirus porcino

10 <400> 3

ES 2 734 374 T3

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Phe Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg
1 5 10 15

Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro
20 25 30

Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg
35 40 45

Leu Ser Arg Thr Ile Gly Tyr Thr Val Lys Lys Thr Thr Val Thr Thr
50 55 60

Pro Ser Trp Asn Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn Asp Phe Leu
65 70 75 80

Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Leu Thr Val Pro Phe Glu Tyr Tyr
85 90 95

Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr
100 105 110

Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn
115 120 125

Phe Val Thr Lys Ala Asn Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr
130 135 140

Ser Ser Arg His Thr Ile Thr Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr
145 150 155 160

Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Arg Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro
165 170 175

Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Thr Gly Asn
180 185 190

Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Ile Tyr Asp
195 200 205

Gln Asp Tyr Asn Ile Arg Ile Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe
210 215 220

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Asn Pro Lys
225 230

5 <210> 4
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> esta secuencia preferiblemente está marcada con isótopos C13 y N15 en el resto de aminoácido C-terminal

<400> 4
Asn Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Lys
1 5 10 15

15 <210> 5

ES 2 734 374 T3

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> esta secuencia preferiblemente está marcada con isótopos C13 y N15 en el resto de aminoácido C-terminal

<400> 5
Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys
 1 5

10 <210> 6
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> esta secuencia preferiblemente está marcada con isótopos C13 y N15 en el resto de aminoácido C-terminal

<400> 6
Ala Thr Thr Val Thr Thr Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg
 1 5 10 15

20 <210> 7
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> esta secuencia preferiblemente está marcada con isótopos C13 y N15 en el resto de aminoácido C-terminal

30 <400> 7
Phe Asn Ile Asp Asp Phe Val Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile
 1 5 10 15

Ser Ile Pro Phe Glu Tyr Tyr Arg
 20

35 <210> 8
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> esta secuencia preferiblemente está marcada con isótopos C13 y N15 en el resto de aminoácido C-terminal

<400> 8
Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr Ser Ser Arg
 1 5 10 15

45 <210> 9
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> esta secuencia preferiblemente está marcada con isótopos C13 y N15 en el resto de aminoácido C-terminal

<400> 9
His Thr Ile Pro Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg
 1 5 10

55 <210> 10
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 734 374 T3

<220>
 <223> esta secuencia preferiblemente está marcada con isótopos C13 y N15 en el resto de aminoácido C-terminal

5 <400> 10
 Tyr Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe Gln
 1 5 10 15

Pro Asn Asn Lys
 20

<210> 11
 <211> 8
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> esta secuencia preferiblemente está marcada con isótopos C13 y N15 en el resto de aminoácido C-terminal

15 <400> 11
 Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg
 1 5

<210> 12
 20 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 25 <223> esta secuencia preferiblemente está marcada con isótopos C13 y N15 en el resto de aminoácido C-terminal

<400> 12
 Met Thr Thr Val Thr Thr Pro Ser Trp Asn Val Asp Met Met Arg
 1 5 10 15

30 <210> 13
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> esta secuencia preferiblemente está marcada con isótopos C13 y N15 en el resto de aminoácido C-terminal

<400> 13
 Phe Asn Ile Asn Asp Phe Leu Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Leu
 1 5 10 15

Thr Val Pro Phe Glu Tyr Tyr Arg
 20

40 <210> 14
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> esta secuencia preferiblemente está marcada con isótopos C13 y N15 en el resto de aminoácido C-terminal

<400> 14
 Ala Asn Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr Ser Ser Arg
 50 1 5 10 15

<210> 15
 <211> 12
 <212> PRT

ES 2 734 374 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> esta secuencia preferiblemente está marcada con isótopos C13 y N15 en el resto de aminoácido C-terminal

5 <400> 15
 His Thr Ile Thr Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg
 1 5 10

10 <210> 16
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> esta secuencia preferiblemente está marcada con isótopos C13 y N15 en el resto de aminoácido C-terminal

<400> 16
 Tyr Phe Thr Pro Lys
 1 5

20 <210> 17
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> esta secuencia preferiblemente está marcada con isótopos C13 y N15 en el resto de aminoácido C-terminal

<400> 17
 Pro Val Leu Asp Arg
 1 5

30 <210> 18
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> esta secuencia preferiblemente está marcada con isótopos C13 y N15 en el resto de aminoácido C-terminal

<400> 18
 Leu Gln Thr Thr Gly Asn Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe
 1 5 10 15

40 Glu Asn Ser Ile Tyr Asp Gln Asp Tyr Asn Ile Arg
 20 25

45 <210> 19
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> esta secuencia preferiblemente está marcada con isótopos C13 y N15 en el resto de aminoácido C-terminal

50 <400> 19
 Ile Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg
 1 5

55 <210> 20
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 734 374 T3

<223> esta secuencia preferiblemente está marcada con isótopos C13 y N15 en el resto de aminoácido C-terminal

<400> 20
Glu Phe Asn Leu Lys
 1 5

5

<210> 21
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10

<220>
 <223> esta secuencia preferiblemente está marcada con isótopos C13 y N15 en el resto de aminoácido C-terminal

<400> 21
Asp Pro Pro Leu Asn Pro Lys
 1 5

15

<210> 22
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20

<220>
 <223> esta secuencia preferiblemente está marcada con isótopos C13 y N15 en el resto de aminoácido C-terminal

25

<400> 22
Tyr Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Arg
 1 5 10

30

<210> 23
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35

<220>
 <223> esta secuencia preferiblemente está marcada con isótopos C13 y N15 en el resto de aminoácido C-terminal

<400> 23
Glu Phe Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Asn Pro Lys
 1 5 10

40

<210> 24
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45

<220>
 <223> esta secuencia preferiblemente está marcada con isótopos C13 y N15 en el resto de aminoácido C-terminal

<400> 24
Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr Gln Gly Asp Arg
 1 5 10

50

<210> 25
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55

<220>
 <223> esta secuencia preferiblemente está marcada con isótopos C13 y N15 en el resto de aminoácido C-terminal

<400> 25
Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn Phe Val Thr Lys
 1 5 10 15

60

ES 2 734 374 T3

<210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> esta secuencia preferiblemente está marcada con isótopos C13 y N15 en el resto de aminoácido C-terminal
 <400> 26
 Ile Ser Ile Pro Phe Glu Tyr Tyr Arg
 10 1 5
 <210> 27
 <211> 8
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> esta secuencia preferiblemente está marcada con isótopos C13 y N15 en el resto de aminoácido C-terminal
 20 <400> 27
 Ser Val Pro Phe Glu Tyr Tyr Arg
 1 5
 <210> 28
 <211> 23
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> this sequence is preferably C13 and N15 isotope labeled at the amino acid residues at sequence positions 7
 30 and 9
 <400> 28
 Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu Tyr Tyr Arg Ile
 1 5 10 15
 Arg Lys Val Lys Val Glu Phe
 20
 35 <210> 29
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> esta secuencia está marcada con isótopos C13 y N15 en el resto de aminoácido C-terminal
 <400> 29
 Ser Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Lys
 45 1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Un método de cuantificación de la presencia de una o más proteínas virales en una muestra que comprende:
- 5 a. añadir a la muestra una cantidad conocida de al menos un péptido firma marcado con un isótopo estable específico a al menos una proteína viral;
- b. digerir la muestra con una proteasa;
- c. efectuar análisis espectroscópicos de masas de la muestra; y
- 10 d. determinar la cantidad de proteína viral en la muestra,
- en el que el péptido firma es el siguiente péptido marcado con un isótopo estable:
- NVDHVGLGTAFENSK (SEC ID N° 4)
- o cualquier péptido que tenga una secuencia de aminoácidos que sea al menos un 80% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 4 en toda la longitud de la SEC ID N° 4.
- 15 2. El método de la reivindicación 1 en el que las una o más proteínas virales son capaces de formar una partícula de tipo viral; y/o en el que la muestra comprende partículas de tipo viral compuestas de una pluralidad de las una o más proteínas virales; y en el que las partículas de tipo viral están compuestas de ORF2 de PCV2a y/o ORF2 de PCV2b.
- 20 3. El método de la reivindicación 1 o 2 en el que la determinación de la cantidad de proteína viral en la muestra comprende determinar la cantidad de proteína viral en la muestra comparando los resultados del análisis espectroscópico de masas de la muestra, en el que, preferentemente, en el análisis espectroscópico de masas, la señal del péptido firma marcado con un isótopo estable se compara con la señal de uno o más péptidos producida por la digestión de la muestra por la proteasa, en particular con la señal de uno o más péptidos generada por la digestión, por parte de la proteasa, de las una o más proteínas virales de la muestra; y/o en el que los péptidos firma se seleccionan de antemano determinando que son específicos a la digestión por proteasa de la proteína viral que ha de cuantificarse y/o que están específicamente ausentes de la digestión por proteasa de la muestra en ausencia de la proteína viral; y/o que, además, comprende:
- 25 a. determinar la cantidad de proteína viral en la muestra comparando los resultados del análisis espectroscópico de masas de la muestra con una curva patrón de calibración; y/o
- 30 b. efectuar análisis espectroscópicos de masas de patrones que contienen cantidades conocidas de péptidos firma marcados y/o no marcados; y
- 35 c. determinar la cantidad de proteína viral en la muestra comparando los resultados del análisis espectroscópico de masas de la muestra con los resultados de los patrones, generándose preferentemente una curva patrón de calibración con los resultados de los patrones, y comparándosela con los resultados del análisis espectroscópico de masas de la muestra;
- y/o en el que la muestra es una muestra de una preparación, y en el que, preferentemente, la preparación es una preparación de una vacuna y/o en el que la muestra es una muestra de preparación de una vacuna, y en el que la preparación contiene opcionalmente agentes que se unen a dicha proteína viral.
- 40 4. Un método de cuantificación de la presencia de una o más proteínas virales en una muestra de una preparación que contiene agentes que se unen a dicha proteína viral que comprende:
- a. digerir la muestra con una proteasa;
- 45 b. añadir a la muestra una cantidad conocida de al menos un péptido firma marcado con un isótopo estable específico a al menos una proteína viral, seleccionándose de antemano dichos péptidos firma determinando que:
- 50 i. dichos péptidos firma son específicos a la digestión por proteasa de la proteína viral que ha de cuantificarse;
- ii. dichos péptidos firma están específicamente ausentes de la digestión por proteasa de la preparación en ausencia de la proteína viral;
- 55 iii. dichos péptidos firma producen una intensa señal en un análisis espectrográfico de masas; y
- iv. dichos péptidos firma producen una señal limpia en un análisis espectrográfico de masas; y

- c. efectuar análisis espectroscópicos de masas de la muestra y de patrones que contienen cantidades conocidas de péptidos firma marcados y no marcados; y
- d. determinar la cantidad de proteína viral en la muestra de preparación de una vacuna comparando los resultados del análisis espectroscópico de masas de la muestra con los resultados de los patrones;
- 5 en el que el péptido firma es el siguiente péptido marcado con un isótopo estable:
- NVDHVGLGTAFENSK (SEC ID N° 4)
- o cualquier péptido que tenga una secuencia de aminoácidos que sea al menos un 80% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 4 en toda la longitud de la SEC ID N° 4.
- 10 **5.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en el que la proteína es una proteína de la cápside viral, preferentemente ORF2 de un circovirus porcino (PCV) o VP2 de parvovirus porcino (PPV), y en el que la proteína es opcionalmente ORF2 de PCV2.
- 6.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 en el que la preparación que contiene agentes que se unen a dicha proteína viral comprende suero porcino y/o suero de otra especie, y en el que los agentes que se unen a dicha proteína viral comprenden, opcionalmente, anticuerpos.
- 15 **7.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que dicho péptido está marcado, en particular en el resto de aminoácido C-terminal, con al menos un isótopo estable seleccionado entre H², C¹³ y N¹⁵, y/o en el que el péptido firma es:
- NVDHVGLGTAFENS[KC¹³N¹⁵] (SEC ID N° 4).
- 20 **8.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 en el que la proteína es una mezcla de ORF2 de subtipos de PCV2, y en el que los subtipos de PCV2 son opcionalmente PCV2a y PCV2b.
- 9.** El método de la reivindicación 8, en el que el ORF2 de PCV2a comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 94% o, preferiblemente, al menos un 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1 o de la SEC ID N° 3 o en el que el ORF2 de PCV2b comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 94% o, preferiblemente, al menos un 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2, y en el que el ORF2 de PCV2b tiene, opcionalmente, la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2.
- 25 **10.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9 en el que el péptido firma es, para ORF2 de PCV2a: NVDHVGLGTAFENS[KC¹³N¹⁵] (SEC ID N° 4).
- 11.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 to 10 que, además, comprende, antes de la digestión por proteasa, la inmunopurificación de la proteína viral, y en el que la inmunopurificación, opcionalmente, comprende:
- 30 a. poner las proteínas virales en contacto con anticuerpos que se unen específicamente a las proteínas virales que corresponden a la secuencia de los péptidos firma, fijándose dichos anticuerpos a un sustrato, y formándose con ello complejos sustrato/anticuerpo-proteína;
- 35 b. lavar el sustrato con un eluyente que no cause la disociación de los complejos anticuerpo-proteína;
- c. poner en contacto los complejos anticuerpo-proteína con una proteasa; y
- d. eluir los péptidos generados por la digestión por proteasa con un eluyente que cause la disociación de los complejos anticuerpo-péptido,
- 40 en el que los péptidos así obtenidos son usados en etapas subsiguientes; y/o que, además, comprende, antes de la digestión por proteasa, hacer pasar la preparación por una columna cromatográfica de exclusión por tamaño y seleccionar las fracciones eluidas de la columna que contienen proteína viral de fracciones que contienen otros compuestos en la preparación, en función del tamaño molecular; y/o en el que se seleccionan las fracciones que contienen partículas de tipo viral (VLP) intactas; y/o que, además, comprende, después de la digestión por proteasa, la inmunopurificación de la digestión de la proteína viral; y/o en el que se usan al menos dos péptidos firma marcados con un isótopo estable, y en el que un primer péptido firma es usado para la cuantificación del péptido viral en la preparación y un segundo péptido firma es usado para la determinación cualitativa de la estabilidad del péptido en la preparación.
- 45 **12.** El método de la reivindicación 11 en el que la determinación cualitativa mide si hay presente proteína viral degradada en la muestra.
- 13.** El método de la reivindicación 12 en el que la preparación de la vacuna contiene agentes que se unen a una proteína viral de la vacuna viral; y/o que comprende
- 50

- 5
- a. añadir a la muestra una cantidad conocida de al menos un péptido firma marcado con un isótopo estable específico a al menos una proteína viral;
 - b. digerir la muestra con una proteasa;
 - c. efectuar análisis espectroscópicos de masas de la muestra; y
 - d. determinar la cantidad de proteína viral en la preparación de la vacuna; y/o
- 10 en el que la determinación de la cantidad de proteína viral en la preparación de la vacuna comprende determinar la cantidad de proteína viral en la muestra de preparación de una vacuna comparando los resultados del análisis espectroscópico de masas de la muestra, comparándose, preferentemente, en el análisis espectroscópico de masas, la señal del péptido firma marcado con un isótopo estable con la señal de uno o más péptidos producida por la digestión de la muestra por la proteasa, en particular con la señal de uno o más péptidos producida por la digestión por proteasa de las una o más proteínas virales de la muestra; y/o en el que los péptidos firma se seleccionan de antemano determinando que son específicos a la digestión por proteasa de la proteína viral que ha de cuantificarse y/o que están específicamente ausentes de la digestión por proteasa de la preparación en ausencia de la proteína viral.
- 15
14. El método de la reivindicación 12 o 13 que, además, comprende:
- a. determinar la cantidad de proteína viral en la muestra de preparación de una vacuna comparando los resultados del análisis espectroscópico de masas de la muestra con una curva patrón de calibración; y/o
 - b. efectuar análisis espectroscópicos de masas de patrones que contienen cantidades conocidas de péptidos firma marcados y/o no marcados; y
 - c. determinar la cantidad de proteína viral en la muestra de preparación de una vacuna comparando los resultados del análisis espectroscópico de masas de la muestra con los resultados de los patrones, generándose preferentemente una curva patrón de calibración con los resultados de los patrones, y comparándosela con los resultados del análisis espectroscópico de masas de la muestra.
- 20
15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 11 o de una cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14 en el que los agentes que se unen a dicha proteína viral son anticuerpos que, preferiblemente, se unen a dichas una o más proteínas virales con una afinidad constante de 10^5 mol^{-1} a 10^{12} mol^{-1} .
- 25
16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15 en el que la MRM-MS comprende:
- a. digerir una muestra de la preparación de la vacuna con una proteasa;
 - b. añadir a la muestra una cantidad conocida de al menos un péptido firma marcado con un isótopo estable específico a al menos una proteína viral, seleccionándose de antemano dichos péptidos firma determinando que:
 - i. dichos péptidos firma son específicos a la digestión por proteasa de la proteína viral que ha de cuantificarse;
 - ii. dichos péptidos firma están específicamente ausentes de la digestión por proteasa de la preparación en ausencia de la proteína viral;
 - iii. dichos péptidos firma producen una intensa señal en un análisis espectrográfico de masas; y
 - iv. dichos péptidos firma producen una señal limpia en un análisis espectrográfico de masas; y
 - c. efectuar análisis espectroscópicos de masas de la muestra y de patrones que contienen cantidades conocidas de péptidos firma marcados y no marcados; y
 - d. determinar la cantidad de proteína viral en la muestra de preparación de una vacuna comparando los resultados del análisis espectroscópico de masas de la muestra con los resultados de los patrones.
- 30
17. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 en el que la realización de los análisis espectroscópicos de masas comprende:
- a. ionizar la muestra;
 - b. separar una pluralidad de iones según su masa o sus razones de masa a carga; y
 - c. detectar al menos un ion correspondiente a la proteína viral, y
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55

en el que la separación incluye opcionalmente la clasificación de la pluralidad de iones por masa.

18. El método de la reivindicación 17 que, además, comprende generar una señal para la detección representativa de una masa para el al menos un ion de la proteína viral, y que, opcionalmente, comprende además procesar un espectro para la masa del al menos un ion de la proteína viral a partir de la señal.

5 **19.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones 17 o 18 que, además, comprende generar un espectro de masa de la pluralidad de iones para la muestra según las razones de masa a carga; y/o que, además, comprende seleccionar un dispositivo de espectrometría de masas para detectar el al menos un ion; y/o que, además, comprende detectar un segundo ion correspondiente a otra proteína viral dentro de la muestra; y/o que, además, comprende usar un espectrómetro de masas de triple cuadrípulo para efectuar los análisis.

10 **20.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en el que la realización de análisis espectroscópicos de masas comprende:

a. seleccionar un ion de interés relacionado con el péptido firma;

b. filtrar una pluralidad de iones generados por una ionización de partículas dentro de la muestra; y

15

c. analizar fragmentos de ion correspondientes al ion de interés; y/o

en el que la realización de los análisis espectroscópicos de masas comprende:

a. ionizar la muestra;

20

b. separar una pluralidad de iones según sus razones de masa a carga; y

c. detectar al menos un ion correspondiente a la proteína viral, y/o

25

en el que la proteasa se selecciona del grupo constituido por tripsina, quimotripsina, pepsina, trombina, papaína, bromelina, termolisina, subtilisina, factor Xa, proteasa de *Staphylococcus aureus*, carboxipeptidasa A, y combinaciones de los mismos.

21. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o de las reivindicaciones 17 a 20 en el que la muestra es una muestra de material de origen animal o una muestra de una preparación de material de origen animal, en el que el material de origen animal se selecciona preferentemente de fluido y tejido corporal, y en el que el material de origen animal se selecciona, preferiblemente, entre sangre, suero sanguíneo, plasma sanguíneo, orina, calostro, secciones tisulares y biopsias tisulares.

30

22. Un método de diagnóstico o monitorización de una infección viral que comprende el método de la reivindicación 21 y en el que la infección viral es, opcionalmente, una infección con PCV2, en particular una infección con PCV2a y/o PCV2b, y/o en el que el animal es, opcionalmente, un cerdo.

23. Un péptido aislado marcado por masa que es el siguiente péptido marcado por isótopo estable:

35

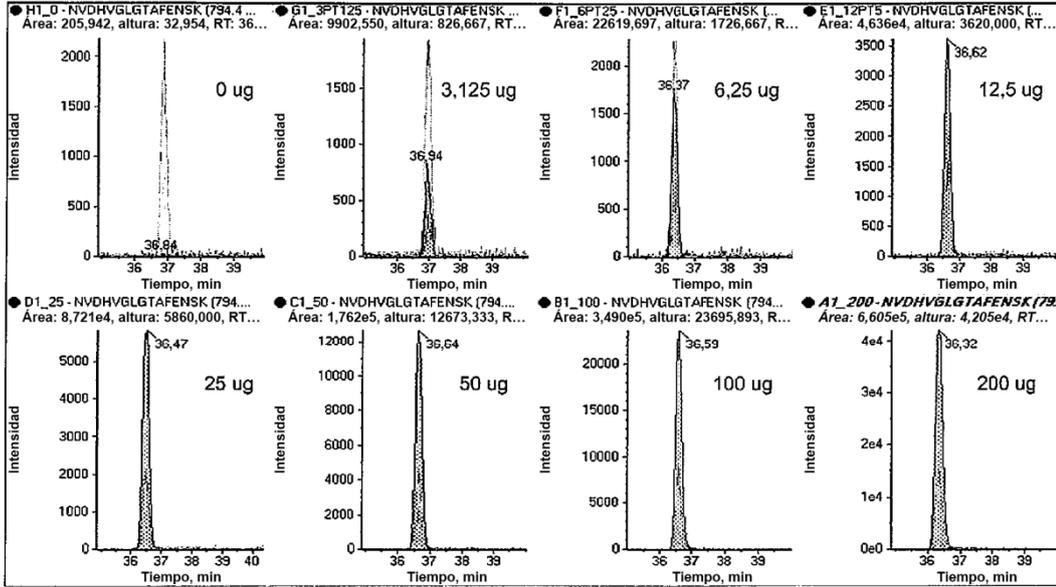
NVDHVGLGTAFENSK (SEC ID N° 4), en el que dicho péptido está preferiblemente marcado, en particular en el resto de aminoácido C-terminal, con al menos un isótopo estable seleccionado entre H², C¹³ y N¹⁵.

24. Un péptido aislado marcado por masa que es:

NVDHVGLGTAFENS[KC¹³N¹⁵] (SEC ID N° 4).

FIG. 1

(a)



(b)

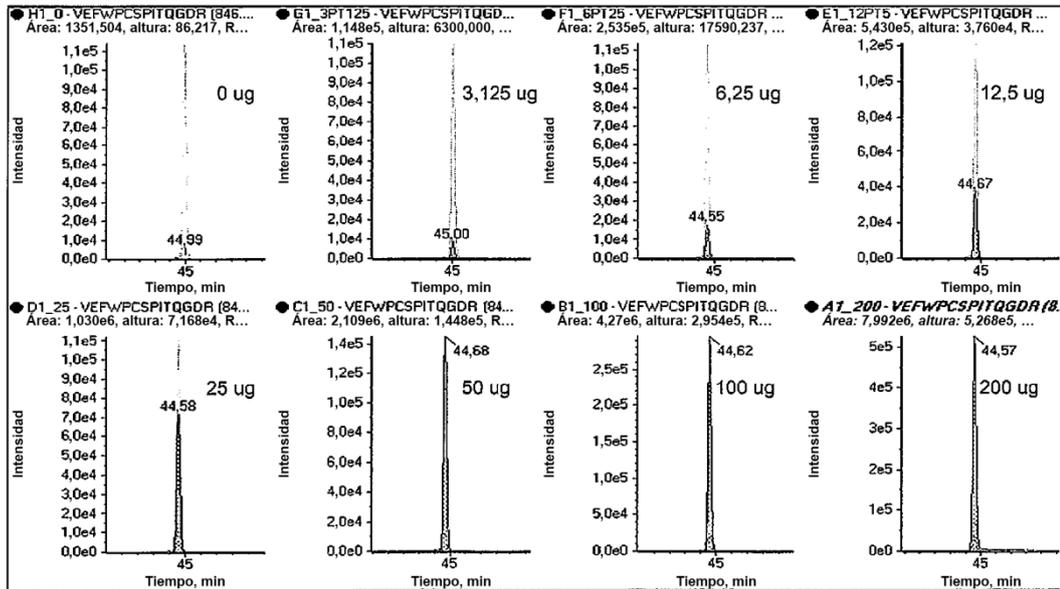
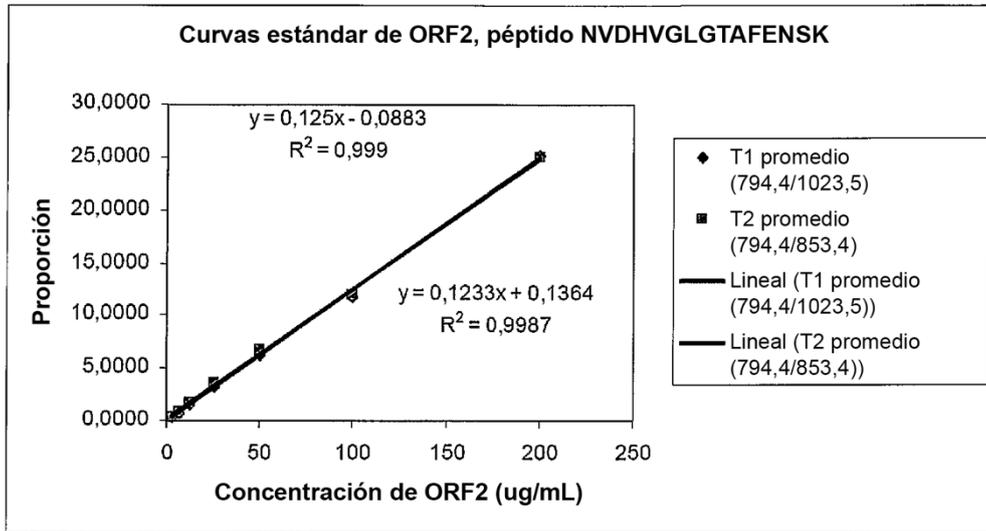


FIG. 2

(a)



(b)

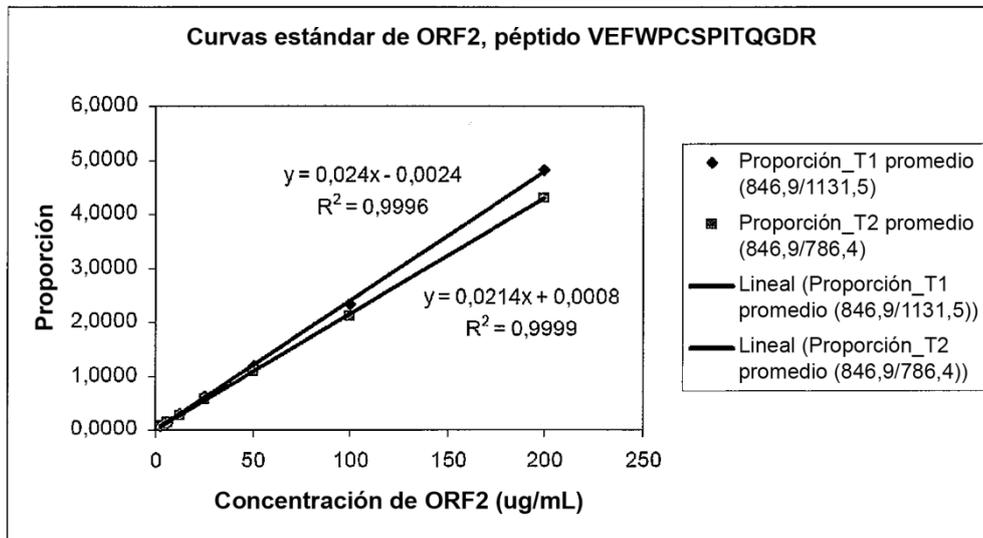


FIG. 3

