



No. 11-144904- -00000-0000

Fecha: 2011-10-26 16:57:03 Dep. 2020 DIR.NUEVAS
Tra. 11 PATENTEIYII Eva: 378 FASENACIONA
Act. 411 PRESENTACION Folios: 156

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. EXPEDIENTE No. _____

MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA INMUNIZACIÓN CONTRA VIRUS

54. TITULO _____

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL _____

ACADEMIA SINICA

71. SOLICITANTE _____

TAIPEI, TAIWAN

DOMICILIO _____

74. APODERADO _____ JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

22. BOGOTÁ, D.C. _____

AS: 118.339

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-144904-00000-0000

ción

Fecha: 2011-10-26 16:57:03 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Follos: 156FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1

SOLICITUD DE:



Patente de Invención.



Patente de Modelo de Utilidad.



Capítulo I.



Capítulo II.

2

SOLICITANTE

Nombre: ACADEMIA SINICA

Dirección: 128 Academia Road, Section 2, Nankang
Taipei, 11529, Taiwán.

Nacionalidad o Domicilio: Taiwán

Lugar de Constitución: Taiwán

Teléfono:

Fax:

E-mail

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐NIT ☐C.E. ☐Otro ☐

Cual

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

Dirección: Calle 70 A #4-41, Bogotá, Colombia.

Teléfono: 744-2200

Fax: 742-2200

E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒NIT ☐C.E. ☐Otro ☐

Cual

Número 80.410.337 TP 57492

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial,
sírvase indicar el número de radicación (del poder). _____

4

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: WONG, Chi-Huey; MA, Che; WANG, Cheng-Chi; CHEN, Juine-Ruey

Dirección: 10550 N. Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, Estados Unidos de América; 2F No. 9-1
Alley 2 Lane 61, Academia Rd. Section 2, Nankang Dist, Taipei, 115, Taiwán; 2F No. 19 Lane 62 Taishun
Street, Da'an Dist, Taipei, 106, Taiwán; No.182, Dajhou Rd, Sansing Township, No.182, Dajhou Rd,
Sansing Township, Yilan, 266, Taiwán; respectivamente.

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América y Taiwan respectivamente.

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2010/028968

Fecha 26.03.2010

Publicación Internacional No. WO 2010/111687 A2

Fecha 30.09.2010

6 Título (54): MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA INMUNIZACIÓN CONTRA VIRUS

7 Clasificación Internacional (51):

8 Prioridad

SI ☒NO ☐

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

US

27.03.2009

61/164,385

US

28.03.2009

61/164,387

US

28.03.2009

61/164,388

US

28.03.2009

61/164,389

US

12.03.2010

61/313,676

9 Comprobante de pago No. 11-87808, 11-67998, 11-86235, 11-86245, 11-32067, 11-63244

Fecha 25-10-2011

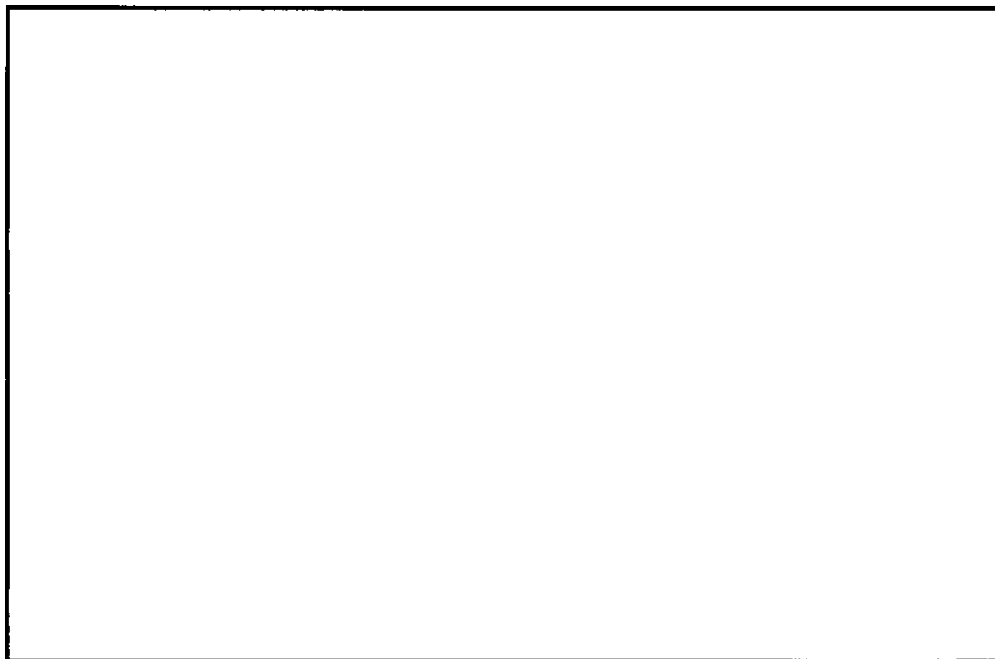
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. \$ 571.000
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal de la persona jurídica peticionaria, en cuanto no esté inscrita en alguna Cámara de Comercio Colombiana.
- ☐ Poderes, si fuere el caso. Fotocopia autenticada.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante. Fotocopia autenticada.
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al español (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción de examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional bajo el Art. 34.
- ☒ Otros: Comprobante(s) de pago de la tasa por concepto de reivindicaciones adicionales \$ 2.052.000 (76*\$27.000).

11 FIGURA CARACTERÍSTICA:



12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

FIRMA:

C.C. 80.410.337 de Usaquén TP 57492 del C.S.J.

15.118.339

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
-/-

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0087808

Bogotá D.C., Septiembre 07 de 2011 - 17:00:11

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A.

NI 860.047.372

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	411762621	07/09/2011	31.119.100.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	7 TRAMITES DE SOL. DE DISENOS INDUSTRIALES	571.000.00	571.000.00
				\$571.000.00

SON: **CIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable:

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 11-144904-00000-0000
Fecha: 2011-10-26 16:57:03 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 156

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Septiembre 7 de 2011 - 17:00:19

AS-118.339

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0067998

Bogotá D.C., Julio 14 de 2011 - 12:15:30

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A. NI 860.047.372

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	456017321	13/07/2011	35.907.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	50.000.00	50.000.00
				\$50.000.00

SON: **CINCUENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: [Signature]

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-144904- -00000-0000

Fecha: 2011-10-26 16:57:03 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 156

15.118.339

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0086235

Bogotá D.C., Septiembre 05 de 2011 - 08:04:49

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A.

NI 860.047.372

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	391971650	01/09/2011	63.528.100.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	135.000.00	135.000.00
				\$135.000.00

SON: **CIENTO TREINTA Y CINCO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-144904- -00000-0000

Fecha: 2011-10-26 16:57:03 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 156

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Septiembre 5 de 2011 - 08:05:12

AS. 118.339

6

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 11 - 0086245
		Bogotá D.C., Septiembre 05 de 2011 - 08:04:49

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A. NI 860.047.372

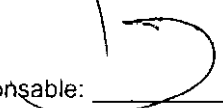
*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	391971650	01/09/2011	63.528.100.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDIARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	540.000.00	540.000.00
				\$540.000.00
=====				

SON: **QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 
****_
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-144904- -00000-0000

Fecha: 2011-10-26 16:57:03 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Follos: 156

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Septiembre 5 de 2011 - 08:05:12

AS. 118.3397

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
-/-

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 11 - 0032067
		Bogotá D.C., Abril 06 de 2011 - 14:16:52

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A. NI 860.047.372

RE

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	999999999	31983	06/04/2011		1.300.00
RECIBO DE CA	999999999	31994	06/04/2011		1.298.700.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO Vr.CONCEPTO
1 50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	1.300.000.00 1.300.000.00
			\$1.300.000.00
			=====

SON: **UN MILL&OACUTE;N TRESCIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-144904- -00000-0000

Fecha: 2011-10-26 16:57:03 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 156

AS. 118.339

8

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0063244

Bogotá D.C., Junio 30 de 2011 - 08:30:19

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A. NI 860.047.372

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	430542291	29/06/2011	29.559.200.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	54 INFORMACION DETALLADA DE UN TRAMITE	27.000.00	27.000.00
				\$27.000.00

SON: **VEINTISIETE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 11-144904-00000-0000
Fecha: 2011-10-26 16:57:03 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 156

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Junio 30 de 2011 - 08:30:29

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
30 September 2010 (30.09.2010)



(10) International Publication Number
WO 2010/111687 A2

(51) International Patent Classification:

A61K 39/145 (2006.01) A61K 39/29 (2006.01)
C07K 14/11 (2006.01) A61K 39/21 (2006.01)
C07K 14/135 (2006.01) C12P 21/02 (2006.01)
C07K 14/18 (2006.01) A61P 31/12 (2006.01)
C07K 14/155 (2006.01) A61P 31/16 (2006.01)
A61K 39/155 (2006.01) A61P 31/14 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01) A61P 31/18 (2006.01)

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): WONG, Chi-Huey [US/US]; 10550 N. Torrey Pines Road, La Jolla, California 92037 (US). MA, Che; 2F No. 9-1 Alley 2 Lane 61, Academia Rd. Section 2, Nankang Dist, Taipei, 115 (TW). WANG, Cheng-Chi; 2F No. 19 Lane 62 Taishun Street, Da'an Dist., Taipei, 106 (TW). CHEN, Julne-Ruey; No.182, Dajhou Rd, Sansing Township, No.182, Dajhou Rd, Sansing Township, Yilan, 266 (TW).

(21) International Application Number:

PCT/US2010/028968

(22) International Filing Date:

26 March 2010 (26.03.2010)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

61/164,385	27 March 2009 (27.03.2009)	US
61/164,387	28 March 2009 (28.03.2009)	US
61/164,388	28 March 2009 (28.03.2009)	US
61/164,389	28 March 2009 (28.03.2009)	US
61/313,676	12 March 2010 (12.03.2010)	US

(71) Applicant (for all designated States except US):
ACADEMIA SINICA; 128 Academia Road, Section 2, Nankang, Taipei, 11529 (TW).

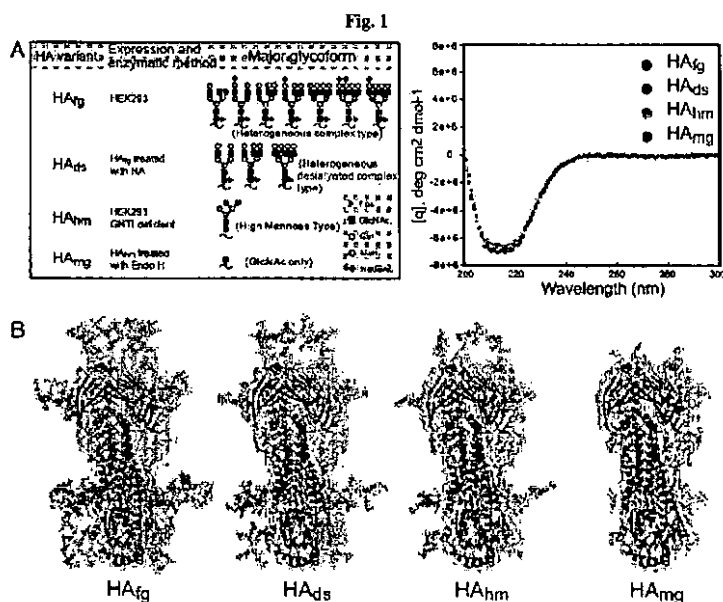
(74) Agents: BASU, Shantanu et al.; Eckman Basu LLP, 2225 E Bayshore Road, Suite 200, Palo Alto, California 94303 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,

[Continued on next page]

(54) Title: METHODS AND COMPOSITIONS FOR IMMUNIZATION AGAINST VIRUS



(57) Abstract: Immunogenic compositions comprising partially glycosylated viral glycoproteins for use as vaccines against viruses are provided. Vaccines formulated using mono-, di-, or tri-glycosylated viral surface glycoproteins and polypeptides provide potent and broad protection against viruses, even across strains. Pharmaceutical compositions comprising monoglycosylated hemagglutinin polypeptides and vaccines generated therefrom and methods of their use for prophylaxis or treatment of viral infections are disclosed. Methods and compositions are disclosed for influenza virus HA, NA and M2, RSV proteins F, G and SH, Dengue virus glycoproteins M or E, hepatitis C virus glycoprotein E1 or E2 and HIV glycoproteins gp120 and gp41.

WO 2010/111687 A2

ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))

- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))
- of inventorship (Rule 4.17(iv))

Published:

- without international search report and to be republished upon receipt of that report (Rule 48.2(g))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA SEGÚN EL TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional(43) Fecha de Publicación Internacional
30 de Septiembre de 2010 (30.09.2010)(10) Número de Publicación Internacional
WO 2010/111687 A2

PCT

(51) Clasificación Internacional de Patentes:

A61K 39/145 (2006.01) A61K 39/29 (2006.01)
 C07K 14/11 (2006.01) A61K 39/21 (2006.01)
 C07K 14/135 (2006.01) C12P 21/02 (2006.01)
 C07K 14/18 (2006.01) A61P 31/12 (2006.01)
 C07K 14/155 (2006.01) A61P 31/16 (2006.01)
 A61K 39/155 (2006.01) A61P 31/14 (2006.01)
 A61K 39/12 (2006.01) A61P 31/18 (2006.01)

(72) Inventores, e

(75) Inventores/Solicitantes (para US únicamente):
WONG, Chi-Huey [US/US]; 10550 N. Torrey Pines Road, La Jolla, California 92037 (US). **MA, Che**; 2F No. 9-1 Alley 2 Lane 61, Academia Rd. Section 2, Nankang Dist, Taipei, 115 (TW). **WANG, Cheng-Chi**; 2F No. 19 Lane 62 Taishun Street, Da'an Dist., Taipei, 106 (TW). **CHEN, Juine-Ruey**; No.182, Dajhou Rd, Sansing Township, No.182, Dajhou Rd, Sansing Township, Yilan, 266 (TW).

(21) No. Solicitud Internacional:

PCT/US2010/028968

(22) Fecha de Presentación Internacional:

Marzo 26 de 2010 (26.03.2010)

(25) Idioma de Presentación:

Inglés

(26) Idioma de Publicación:

Inglés

(30) Datos relativos a la Prioridad:

61/164,385	27 de Marzo de 2009 (27.03.2009)	US
61/164,387	28 de Marzo de 2009 (28.03.2009)	US
61/164,388	28 de Marzo de 2009 (28.03.2009)	US
61/164,389	28 de Marzo de 2009 (28.03.2009)	US
61/313,676	12 de Marzo de 2009 (12.03.2010)	US

(71) Solicitante (para todos los países destinatarios con excepción de US): **ACADEMIA SINICA**; 128 Academia Road, Section 2, Nankang, Taipei, 11529 (TW).

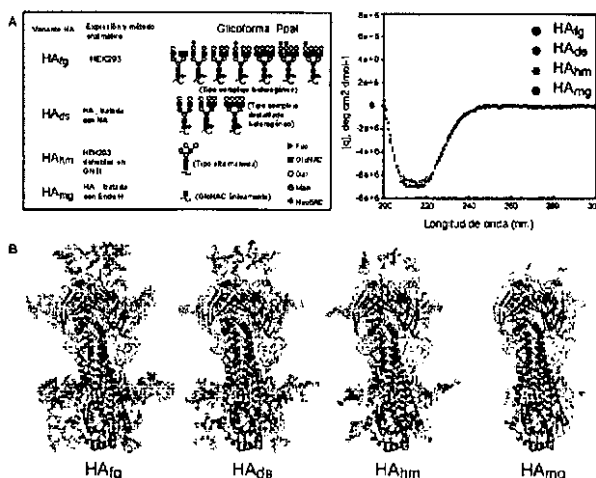
(74) Agentes: **BASU, Shantanu et al.**; Eckman Basu LLP, 2225 E Bayshore Road, Suite 200, Palo Alto, California 94303 (US).

(81) Países designados (a menos que se indique lo contrario para cada clase de protección disponible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Países designados (a menos que se indique lo contrario para cada clase de protección disponible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD,

[Continúa en la página siguiente]

(54) Título: MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA INMUNIZACIÓN CONTRA VIRUS



(57) Extracto: Se proveen composiciones inmunógenas que incluyen glucoproteínas víricas parcialmente glucosiladas para uso como vacunas contra virus. Las vacunas formuladas utilizando glucoproteínas de superficie víricas ofrecen protección amplia y potente contra virus, incluso a través de cepas. Se divulgan composiciones farmacéuticas que contienen polipéptidos de hemaglutinina monoglucosilada, y vacunas generadas a partir de ellos, y métodos de su uso para profilaxis o tratamiento de infecciones virales. Se divulgan métodos y composiciones para HA, NA y M2 del virus de la gripe, proteínas F, G y SH del VRS (virus respiratorio sincital), glucoproteínas M o E del virus del dengue, glucoproteína E1 o E2 del virus de la hepatitis C y glucoproteínas gp120 y gp41 del VIH (virus de la inmunodeficiencia humana).



SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiática (AM, AZ, BY, — *en cuanto al derecho del solicitante de reclamar*
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europea (AT, BE, BG, CH, *prioridad de de la solicitud anterior (Regla*
CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, *4.17(iii))*
IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, — *de la designación de los inventores (Regla 4.17(iv))*
SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

Declaraciones bajo la Regla 4.17:

- *en cuanto al derecho del solicitante de solicitar y que se le otorgue una patente (Regla 4.17(ii))*
- *sin informe de búsqueda internacional y a volverse a publicar al recibo de ese informe (Regla 48.2(g))*
- *con parte del listado de secuencias de la descripción (Regla 5.2 (a))*

MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA INMUNIZACIÓN CONTRA VIRUS

INVENTORES:

Chi-Huey WONG, Che MA, Cheng-Chi WANG, Juine-Ruey CHEN

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud reclama prioridad de la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos No. Consecutivo 61/164,385, titulada "METHODS AND COMPOSITIONS FOR IMMUNIZATION AGAINST INFLUENZA", presentada el 27 de marzo de 2009, solicitud de patente provisional de los Estados Unidos No. Consecutivo 61/164,387, titulada "METHODS AND COMPOSITIONS FOR IMMUNIZATION AGAINST HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS", presentada el 28 de marzo de 2009, solicitud de patente provisional de los Estados Unidos No. Consecutivo 61/164,388, titulada "METHODS AND COMPOSITIONS FOR IMMUNIZATION AGAINST FLAVIVIRUS", presentada el 28 de marzo de 2009, solicitud de patente provisional de los Estados Unidos No. Consecutivo 61/164,389, titulada "METHODS FOR MANUFACTURING VACCINES AGAINST VIRAL INFECTION", presentada el 28 de marzo de 2009, solicitud de patente provisional de los Estados Unidos No. Consecutivo 61/313,676, titulada "METHODS AND COMPOSITIONS FOR IMMUNIZATION AGAINST INFLUENZA", presentada el 12 de marzo de 2010, el contenido de todas las cuales se incorpora en esta especificación por referencia en su totalidad.

REFERENCIA A UN LISTADO DE SECUENCIAS

[0002] Esta solicitud incluye un Listado de Secuencias. Una versión electrónica del Listado de Secuencias se está remitiendo por EFS-Web al

mismo tiempo con esta especificación como un archivo ASCII, creado el 24 de marzo de 2010, designado SEQ_LIST_OPK50101_ST25, el cual tiene 42.952 bytes de tamaño. La información contenida en el Listado de Secuencias se incorpora en esta especificación por referencia en su totalidad.

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

[0003] La invención se refiere por lo general a polipéptidos víricos parcialmente glucosilados, que son útiles para generar composiciones inmunógenas potentes, ampliamente reactivas, efectivas contra el virus. En particular, la invención se refiere a vacunas generadas utilizando el péptido hemaglutinina (HA) del virus de la gripe, monoglucosilado, vacunas que exhiben una potente actividad contra los virus de la gripe. La invención se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen las glucoproteínas y vacunas generadas a partir de ellas, y a métodos de usar los polipéptidos HA desglucosilados para profilaxis y tratamiento de infecciones causadas por el virus de la gripe.

ARTE PREVIO DE LA INVENCION

[0004] En eucariotas, los residuos de azúcar se enlazan comúnmente a cuatro diferentes residuos de aminoácido. Estos residuos de aminoácido se clasifican como O-enlazados (serina, treonina, e hidroxilisina) y N-enlazados (asparagina). Los azúcares O-enlazados se sintetizan en el aparato de Golgi o el Retículo Endoplásmico rugoso (ER - *Endoplasmic Reticulum*) a partir de los azúcares nucleotídicos. Los azúcares N-enlazados se sintetizan de un precursor común y, posteriormente, se procesan. Se sabe que la adición de cadenas de carbohidratos N-enlazados es importante para la estabilización del plegamiento, prevención de la degradación en el retículo endoplásmico, oligomerización, actividad biológica, y transporte de glucoproteínas. La adición de oligosacáridos N-enlazados a residuos Asn

específicos juega un papel importante en regular la actividad, estabilidad o antigenicidad de proteínas maduras de virus (Opdenakker G. et al., *FASEB Journal* 7, 1330-1337 1993). Se ha sugerido igualmente que la glucosilación N-enlazada se requiere para el plegamiento, transporte, expresión en la superficie celular, secreción de glucoproteínas (Helenius, A., *Molecular Biology of the Cell* 5, 253-265 1994), protección de la degradación proteolítica y mejoramiento de la solubilidad de glucoproteínas (Doms et al., *Virology* 193, 545-562 1993). Las glucoproteínas de superficie víricas no sólo se requieren para el plegamiento correcto de la proteína, sino además ofrecen protección contra anticuerpos neutralizantes como un "escudo glicano." Como resultado, la fuerte selección específica del anfitrión se asocia frecuentemente con las posiciones del codón de glucosilación potencial N-enlazada. En consecuencia, los sitios de glucosilación N-enlazada tienden a conservarse a través de cepas y clados.

[0005] Existen tres principales tipos del virus de la gripe: A, B y C. Las cepas tipo A del virus de la gripe pueden causar enfermedad grave y son el único tipo que ha ocasionado pandemias humanas. La cepa H5N1 es un virus de la gripe tipo A. Las cepas tipo B originan casos humanos esporádicos y brotes de pequeña escala. Las cepas tipo C sólo rara vez producen infección humana y no han dado pie grandes brotes. De los virus de la gripe A, únicamente los subtipos H1, H2 y H3 se han transmitido fácilmente entre humanos.

[0006] Los brotes del virus de la gripe A continúan causando morbilidad y mortalidad ampliamente extendidas en todo el mundo. Tan sólo en los Estados Unidos, un estimativo del 5 al 20% de la población es infectada anualmente por el virus de la gripe A, causando cerca de 200.000 hospitalizaciones y 36.000 fallecimientos. El establecimiento de políticas de vacunación integrales ha sido una medida efectiva para limitar la morbilidad de la gripe. No obstante, la frecuente deriva genética del virus exige la reformulación anual de la vacuna, conduciendo potencialmente a

un desajuste entre la cepa vírica presente en la vacuna y la que está en circulación. Por consiguiente, las terapias antivirales contra el virus de la gripe son herramientas importantes para limitar tanto la gravedad como la transmisión de la enfermedad.

[0007] Los virus de la gripe H5N1 altamente patógenos han originado brotes en las aves de corral y las aves silvestres desde 2003 (Li KS et al. (2004) *Nature* 430:209-213). A febrero de 2010, estos virus han infectado no sólo especies aviares sino también más de 478 humanos, de los cuales 286 casos demostraron ser fatales (www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2010_02_17/en/index.html). Los virus altamente patógenos H5N1 y (H1N1) de la gripe A, originada en cerdos en el 2009, han causados brotes globales y planteado una gran preocupación de que puedan ocurrir cambios posteriores en los virus para provocar una pandemia mortal (Garten RJ, et al. (2009) *Science* 325:197-201, Neumann G, et al. (2009) *Nature* 459:931-939). Existe una gran inquietud de que un virus de la gripe adquiriera la capacidad de diseminarse eficientemente entre humanos, convirtiéndose así en una amenaza pandémica. En consecuencia una vacuna de la gripe tiene que ser una parte integral de cualquier plan de preparación de una pandemia.

[0008] Los virus de la gripe son virus ARN de cadena negativa, segmentados, y pertenecen a la familia Orthomyxoviridae. El virus de la gripe A consta de 9 proteínas estructurales y codifica adicionalmente una proteína NS1 no estructural con funciones reguladoras. La proteína NS1 no estructural se sintetiza en grandes cantidades durante el ciclo de reproducción y se localiza en el citosol y el núcleo de las células infectadas. La naturaleza segmentada del genoma vírico permite que tenga lugar el mecanismo de la reclasificación genética (intercambio de segmentos del genoma) durante la infección mixta de una célula con diferentes cepas víricas. El virus de la gripe A puede clasificarse además en varios subtipos, dependiendo de las diferentes proteínas víricas hemaglutinina (HA) y

neuraminidasa (NA) desplegadas en su superficie. Los subtipos del virus de la gripe A se identifican por dos glucoproteínas de superficie víricas, hemaglutinina (HA o H) y neuraminidasa (NA o N). Cada subtipo del virus de la gripe se identifica por su combinación de proteínas H y N. Existen 16 subtipos HA conocidos y 9 subtipos NA conocidos. Los virus de la gripe tipo A pueden infectar personas, aves, cerdos, caballos, y otros animales, pero las aves silvestres son los anfitriones naturales de estos virus. Sólo algunos subtipos de la gripe A (es decir, H1N1, H1N2, y H3N2) se encuentran actualmente en circulación entre las personas, pero todas las combinaciones de los 16 subtipos HA y los 9 subtipos NA se han identificado en especies aviares, especialmente en aves acuáticas silvestres y aves zancudas. Adicionalmente, existe una evidencia cada vez mayor de que los virus de la gripe H5 y H7 pueden causar igualmente enfermedades humanas.

[0009] La HA del virus de la gripe A consta de dos regiones estructuralmente distintas, a saber, una región de cabeza globular y una región de la cola. La región de cabeza globular contiene un sitio de unión a receptor que es responsable de la adhesión del virus a una célula diana y participa en la actividad de hemaglutinación de HA. La región de la cola contiene un péptido de fusión que es necesario para la fusión de la membrana entre la envoltura vírica y una membrana endosómica de la célula y, por consiguiente, se relaciona con la actividad de fusión (Wiley et al., *Ann. Rev. Biochem.*, 56:365-394 (1987)).

[0010] Los aportes más importantes al entendimiento de las infecciones por gripe han provenido de los estudios sobre la hemaglutinina (HA), una glucoproteína de envoltura vírica que se une a receptores glicano sialilados específicos en las vías respiratorias, que le permiten al virus entrar a la célula (Kuiken T, et al. (2006) *Science* 312:394-397; Maines TR, et al. (2009) *Science* 325:484-487; Skehel JJ, Wiley DC (2000) *Ann Rev Biochem* 69:531-569; van Riel D, et al. (2006) *Science* 312:399-399). Para

atravesar la barrera de la especie e infectar la población humana, la HA aviar tiene que cambiar su preferencia de unión al receptor de un glicano sialilado terminalmente que contiene motivos de ácido siálico $\alpha 2,3$ (aviar)-enlazado a $\alpha 2,6$ (humano)-enlazado (Connor RJ, et al. (1994) *Virology* 205:17-23), y este cambio podría ocurrir a través de únicamente dos mutaciones, como en la pandemia de 1918 (Tumpey TM, et al. (2007) *Science* 315:655-659). Por lo tanto, entender los factores que afectan la unión de gripe a receptores glicano es crítico para desarrollar métodos de controlar cualesquiera cepas futuras de gripe de genotipo producto de un cruce, que tengan potencial pandémico.

[0011] Para abordar la necesidad de elaborar una vacuna candidata de la gripe, que pudiera inducir potentes anticuerpos neutralizantes contra cepas divergentes del virus de la gripe H5N1, una vacuna basada en una secuencia consenso de hemaglutinina (HA) H5N1 desencadenó anticuerpos que neutralizaron un panel de viriones que se habían seudotipado con la HA de varios clados H5N1. (Chen MW, et al. (2008) *Proc Natl Acad Sci USA* 105:13538-13543).

[0012] HA es una proteína transmembrana homotrimérica con un ectodominio compuesto por una región de cabeza globular y una región de la cola (Kuiken T, et al. (2006) *Science* 312:394-397). Las dos regiones llevan oligosacáridos N-enlazados (Keil W, et al. (1985) *EMBO J* 4:2711-2720), los cuales afectan las propiedades funcionales de la HA (Chen ZY, et al. (2008) *Vaccine* 26:361-371; Ohuchi R, et al. (1997) *J Virol* 71:3719-3725). Entre los diferentes subtipos de virus de la gripe A, existe una extensa variación en los sitios de glucosilación de la región de cabeza, mientras que los oligosacáridos de la cola son más conservados y requeridos para la actividad de fusión (Ohuchi R, et al. (1997) *J Virol* 71:3719-3725). Los glicanos cerca de los epítomos peptídicos antigénicos interfieren con el reconocimiento de anticuerpos (Skehel JJ, et al. (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* 81:1779-1783), y los glicanos cerca del sitio de

activación proteolítica de HA modulan la escisión e influyen en la ineffectividad del virus de la gripe (Deshpande KL, et al. (1987) Proc Natl Acad Sci USA 84:36-40). La eliminación mutacional de los sitios de glucosilación de HA puede afectar la unión al receptor vírico (Gunther I, et al. (1993) Virus Res 27:147-160).

[0013] Los cambios en la secuencia peptídica en o cerca de los sitios de glucosilación pueden alterar la estructura 3D de la HA y, por consiguiente, la especificidad y afinidad de la unión a receptor. En efecto, HAs de diferentes subtipos H5N1 tienen diferentes patrones de unión a glicano (Stevens J, et al. (2008) J Mol Biol 381:1382-1394). La mutagénesis de los sitios de glucosilación en H1 y H3 se ha estudiado en el sistema vírico total (Chandrasekaran A, et al. (2008) Nat Biotechnol 26:107-113; Deom CM, et al. (1986) Proc Natl Acad Sci USA 83:3771-3775). No obstante, se desconoce cómo los cambios en la glucosilación afectan la especificidad y afinidad de unión a receptor, especialmente con respecto a la HA H5N1 más patógena.

[0014] Las vacunas de la gripe, cuando se elaboran, tienen que cambiarse cada año ya que las regiones menos altamente glucosiladas o no glucosiladas de hemaglutinina continúan mutando para escapar al sistema inmunitario del anfitrión.

[0015] El objetivo del diseño de vacunas contra patógenos heterogéneos es identificar y diseñar antígenos efectivos y ampliamente protectores. En el caso de la gripe, esfuerzos históricos considerables se han invertido en la experimentación empírica de secuencias lineales conservadas y regiones con poco éxito. Una razón plausible de estas fallas es una falta de conocimiento de que respuestas enfocadas contra artículos de prueba antigénicos son sitios productivos actuales *bona fide* para neutralización de un antígeno en el patógeno en el escenario de una infección actual.

SUMARIO DE LA INVENCION

[0016] Específicamente, existe una necesidad de anticuerpos monoclonales de neutralización cruzada, que pueden usarse en el diseño y validación de procesos para la producción de vacunas, que mantengan o mejoren la calidad y antigénicidad de epítopos de neutralización cruzada en vacunas actuales y fabricadas en el futuro. Asumiendo que la unión del anticuerpo a la vacuna refleja la integridad estructural y el potencial antigénico, se evaluaría la unión de anticuerpos de neutralización cruzada, tales como polipéptidos de HA desglucosilados, a tales derivados de procesos de vacunas para evaluar cuantitativamente su potencial de neutralización cruzada. Para maximizar las respuestas hacia estos epítopos universales, se crearían derivados para aumentar la inmunogenicidad hacia estos epítopos universales.

[0017] De acuerdo con la invención, se divulga una vacuna utilizando estos principios. El antígeno se genera eliminando parcialmente azúcares de la glucoproteína vírica para exponer los sitios de glucosilación (los cuales están altamente conservados y no mutan o no mutan agresivamente) y, al mismo tiempo, conservan azúcares adecuados para preservar la estructura terciaria de la glucoproteína. Las glucoproteínas víricas parcialmente glucosiladas se generan desglucosilando parcialmente las glucoproteínas, de manera que un sitio particular de glucosilación conserve una, dos o tres unidades azúcar. En algunos aspectos las glucoproteína parcialmente glucosilada puede generarse proveyendo una proteína o polipéptido no glucosidado en uno o más sitios at particulares de glucosilación y conjugando un mono-, di- o tri-sacárido a los sitios de glucosilación.

[0018] Se divulga una vacuna que comprende por lo menos una glucoproteína HA, NA o M₂ parcialmente glucosilada y un portador farmacéuticamente aceptable. En algunas implementaciones, la glucoproteína HA parcialmente glucosilada se selecciona del grupo

conformado por virus de la gripe H1, H3, y H5 parcialmente glucosilados. En algunas implementaciones, la glucoproteína HA parcialmente glucosilada se glucosila en residuos asparagina en una o más de las posiciones 39, 127, 170, 181, 302, 495 y 500 de HA H5. En algunas implementaciones, el residuo asparagina está en la posición 177.

[0019] Se divulga un método que comprende administrar a un sujeto, susceptible a la gripe, una vacuna que contiene por lo menos una glucoproteína HA desglucosilada y un portador farmacéuticamente aceptable. En algunas implementaciones, la glucoproteína HA desglucosilada se selecciona del grupo conformado por H1, H3, y H5.

[0020] En algunas implementaciones la desglucosilación deja una monoglucosilación (un azúcar restante) en uno o más sitios de glucosilación en la glucoproteína. En algunas implementaciones la desglucosilación deja una diglucosilación (2 azúcares restantes) en por lo menos un sitio de glucosilación en la glucoproteína. En algunas implementaciones la desglucosilación deja una triglucosilación (3 azúcares restantes) en uno o más sitios de glucosilación en la glucoproteína. En algunas implementaciones la desglucosilación deja por lo menos una de una monoglucosilación, una diglucosilación y una triglucosilación en por lo menos un sitio de glucosilación en la glucoproteína.

[0021] La invención se refiere a una composición inmunógena para suscitar una respuesta inmunitaria a un patógeno de origen vírico, bacteriano, fúngico u otro origen, composición que se compone de: una glucoproteína antígeno del patógeno de origen vírico, bacteriano, fúngico u otro origen, en donde la glucoproteína se glucosila parcialmente.

[0022] En algunos aspectos, el patógeno es un virus y el antígeno parcialmente glucosilado es un virus, una partícula tipo virus, un péptido vírico, una proteína, un polipéptido, o un fragmento de los anteriores

derivado del virus, o una proteína de fusión que contiene parcialmente una secuencia proteínica del virus.

[0023] El virus se selecciona del virus de la gripe, el virus respiratorio sincitial (VRS), clamidia, adenoviridae, mastadenovirus, aviadenovirus, herpesviridae, virus del herpes simple 1, virus del herpes simple 2, virus del herpes simple 5, virus del herpes simple 6, leviviridae, levivirus, enterobacteria fase MS2, allovirus, poxviridae, chordopoxvirinae, parapoxvirus, avipoxvirus, capripoxvirus, leporipoxvirus, suipoxvirus, molluscipoxvirus, entomopoxvirinae, papovaviridae, polyomavirus, papillomavirus, paramyxoviridae, paramyxovirus, virus paragripal 1, morbillivirus, virus del sarampión, rubulavirus, virus de las paperas, pneumonovirinae, pneumovirus, metapneumovirus, pneumovirus aviar, metapneumovirus humano, picornaviridae, enterovirus, rinovirus, hepatovirus, virus de la hepatitis A humana, cardiovirus, andapthovirus, reoviridae, orthoreovirus, orbivirus, rotavirus, cypovirus, fijivirus, phytoreovirus, oryzavirus, retroviridae, retrovirus tipo B mamíferos, retrovirus tipo C mamíferos, retrovirus tipo D aviares, grupo de retrovirus tipo D, retrovirus BLV-HTLV, lentivirus, virus 1 de la inmunodeficiencia humana, virus 2 de la inmunodeficiencia humana, virus HTLV-I y -II, coronavirus SARS, virus del herpes simple, virus de Epstein Barr, cytomegalovirus, virus de la hepatitis (VHC, VHA, VHB, VHD, VHE), virus toxoplasma gondii, virus treponema pallidum, virus T-linfotrópico humano, virus de la encefalitis, virus del Nilo Occidental, virus del dengue, el virus de la varicela zóster, rubéola, paperas, rubella, espumavirus, flaviviridae, virus de la hepatitis C, hepadnaviridae, virus de la hepatitis B, togaviridae, alphavirus sindbis virus, rubivirus, virus de la rubéola, rhabdoviridae, vesiculovirus, virus de la fiebre de Lassa, ephemerovirus, cytorhabdovirus, necleorhabdovirus, arenaviridae, arenavirus, virus de la coriomeningitis linfocítica, Ippy virus, lassa virus, coronaviridae, coronavirus y torovirus.

[0024] El péptido vírico, proteína, polipéptido, o un fragmento de los anteriores se seleccionan de neuraminidasa del virus de la gripe, hemaglutinina del virus de la gripe, proteínas víricas del virus respiratorio sincitial (RSV) humano, glucoproteína F RSV, glucoproteína G RSV, proteínas víricas del virus del herpes simple (VHS), glucoproteínas gB, gC, gD, y gE del virus del herpes simple, antígenos PorB y MOMP de clamidia, nucleoproteína, proteína de matriz u otra proteína del virus del dengue, hemaglutinina del virus del sarampión, glucoproteína gB del virus del herpes simple tipo 2, poliovirus 1 VP1, glucoproteínas de la envoltura del VIH 1, antígeno de superficie de la hepatitis B, toxina de la difteria, epítipo de estreptococo 24M, pilina gonocócica, g50 (gpD) del virus de la pseudorrabia, (gpB) del virus de la pseudorrabia II, (gpC) del virus de la pseudorrabia III, glucoproteína H del virus de la pseudorrabia, glucoproteína E del virus de la pseudorrabia, glucoproteína 195 de la gastroenteritis transmisible, proteína de matriz de la gastroenteritis transmisible, glucoproteína 38 del rotavirus del cerdo, proteína de la cápside del parvovirus del cerdo, antígeno protector *Serpulina hydodysenteriae*, glucoproteína 55 de la diarrea vírica bovina, hemaglutinina-neuraminidasa del virus de la enfermedad de Newcastle, hemaglutinina de la gripe porcina, neuraminidasa de la gripe porcina, virus de la fiebre aftosa, virus del cólera de los cerdos, virus de la gripe porcina, virus de la fiebre porcina africana, *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides*, virus de la rinotraqueítis bovina infecciosa, glucoproteína E del virus de la rinotraqueítis bovina infecciosa, glucoproteína G, virus de la laringotraqueítis infecciosa, glucoproteína G del virus de la laringotraqueítis infecciosa o glucoproteína I, una glucoproteína del virus de La Crosse, virus de la diarrea del ternero recién nacido, virus de la encefalomiелitis equina venezolana, Punta Toro virus, virus de la leucemia murina, virus de tumor mamario de ratón, nucleoproteína del virus de la hepatitis B y antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, o un fragmento o derivado de los anteriores, antígeno del virus de la gripe equina o virus del herpes equino, incluyendo neuraminidasa tipo A del virus de la gripe equina/Alaska 91, neuraminidasa

tipo A del virus de la gripe equina/Miami 63, neuraminidasa tipo A del virus de la gripe equina/Kentucky 81, glucoproteína B del tipo 1 del virus del herpes equino, y glucoproteína D del tipo 1 del virus del herpes equino, antígeno del virus respiratorio sincitial bovino o virus paragripal bovino, proteína de adhesión del virus respiratorio sincitial bovino (BRSV G), proteína de fusión del virus respiratorio sincitial bovino (BRSV F), proteína de la nucleocápside del virus respiratorio sincitial bovino (BRSV N), proteína de fusión tipo 3 del virus paragripal bovino, hemaglutinina neuraminidasa del tipo 3 del virus paragripal bovino, glucoproteína 48 y glucoproteína 53 del virus de la diarrea vírica bovina, glucoproteína E del virus del dengue y glucoproteína E1E2 del virus de la hepatitis C humana.

[0025] En algunos aspectos, el antígeno vírico desglucosilado es una hemaglutinina del virus de la gripe mono-, di-, o tri-glucosilada. En algunas incorporaciones, el antígeno vírico desglucosilado es una hemaglutinina mono-glucosilada seleccionada del grupo conformado por H1, H3, y H5 del virus de la gripe. En algunas incorporaciones, la hemaglutinina mono-glucosilada del virus de la gripe comprende un sitio de N-glucosilación que incluye una secuencia de aminoácidos de asparagina- X_{aa} -serina y asparagina- X_{aa} -treonina, donde X_{aa} es cualquier aminoácido excepto prolina. En algunos aspectos, la hemaglutinina monoglucosilada, que comprende un azúcar mono GlcNAc en un sitio de glucosilación exhibe especificidad disminuida, pero afinidad mejorada hacia la unión a receptor HA.

[0026] En algunas incorporaciones, el antígeno vírico desglucosilado es una hemaglutinina di- o tri-glucosilada del virus de la gripe con N-acetilglucosamina (GlcNAc) y/o manosa. En algunos aspectos, el antígeno vírico desglucosilado es una hemaglutinina mono-glucosilada del virus de la gripe glucosilado con N-acetilglucosamina (GlcNAc).

[0027] En algunos aspectos, la hemaglutinina mono-glucosilada del virus de

la gripe incluye un polipéptido que comprende una secuencia de consenso HA H5 (SEQ ID NO: 4). En algunas incorporaciones, la secuencia de consenso HA H5 mono-glucosilada (SEQ ID NO: 4) se glucosila en residuos asparagina en una o más de las posiciones 39, 170, 181, 302 y 495. En otros aspectos, la hemaglutinina mono-glucosilada del virus de la gripe comprende una secuencia polipeptídica H1 seleccionada del grupo conformado por una secuencia de NIBRG-121 (cepa de la vacuna A(H1N1) pandemia 2009) (SEQ ID NO: 6), una secuencia de consenso H1-A (SEQ ID NO: 8) y una secuencia de consenso H1-C (SEQ ID NO: 10). En algunas incorporaciones, la secuencia HA se modifica para permitir la expresión en una célula eucariota apropiada.

[0028] En una incorporación, la hemaglutinina mono-glucosilada del virus de la gripe comprende un polipéptido H1 estacional (Brisbane).

[0029] La invención se refiere asimismo a una vacuna que contiene un polipéptido inmunógeno que comprende una glucoproteína vírica desglucosilada a un estado de mono-, di-, o tri-glucosilación y, opcionalmente, un coadyuvante, en donde la vacuna es capaz de suscitar una respuesta inmunitaria contra un virus respiratorio. En algunas incorporaciones, el virus respiratorio es un virus de la gripe y la glucoproteína vírica es hemaglutinina (HA).

[0030] En algunos aspectos, el virus de la gripe se selecciona del grupo conformado por un virus de la gripe aviar y un virus de la gripe estacional. En algunas incorporaciones, el virus de la gripe aviar es H5N1. En algunas incorporaciones, el virus de la gripe es un virus de la gripe A.

[0031] En un aspecto, el virus es el virus respiratorio sincitial (VRS), y el antígeno vírico parcialmente glucosilado es una glucoproteína F (fusión), G (adhesión) o SH (hidrófoba pequeña) VRS mono-, di-, o tri-glucosilada, o fragmentos inmunógenos de las anteriores. En algunas incorporaciones, la

secuencia de la proteína G VRS mono-glucosilada (SEQ ID NO: 12) se glucosila parcialmente en residuos asparagina en uno o más sitios potenciales de N-glucosilación indicados en Tabla 6.

[0032] En un aspecto, el virus es un flavivirus, y el antígeno vírico parcialmente glucosilado es una glucoproteína M de envoltura del virus del dengue mono-, di-, o tri-glucosilada, glucoproteína E, o fragmentos inmunógenos de las anteriores. En algunas incorporaciones, la glucoproteína E del virus del dengue mono-glucosilada (SEQ ID NO: 13) se glucosila parcialmente en residuos asparagina en uno o más sitios de N-glucosilación N67 y N153 indicados en Tabla 7.

[0033] En un aspecto, el virus es un virus de la hepatitis C, y el antígeno vírico parcialmente glucosilado es una glucoproteína E1 de envoltura del virus de la hepatitis C mono-, di-, o tri-glucosilada, glucoproteína E2, o fragmentos inmunógenos de las anteriores. En algunas incorporaciones, la glucoproteína E1 de envoltura del virus de la hepatitis C mono-glucosilada (SEQ ID NO: 14) se glucosila parcialmente en residuos asparagina en uno o más sitios de N-glucosilación N196, N209, N234, N305, y N325 indicados en Tabla 8.

[0034] En un aspecto, en donde el virus es un virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), y el antígeno vírico parcialmente glucosilado es una glucoproteína gp120 de envoltura VIH mono-, di-, o tri-glucosilada, glucoproteína gp41 transmembrana, o fragmentos inmunógenos de las anteriores.

[0035] En algunas incorporaciones la glucoproteína gp120 de envoltura VIH mono-glucosilada (SEQ ID NO: 15) se glucosila parcialmente en residuos asparagina en uno o más sitios potenciales de N-glucosilación indicados en Tabla 9.

[0036] La invención se refiere además a una composición de vacuna que comprende: un polipéptido HA de la gripe, en donde el polipéptido HA de la gripe se desglucosila a un estado de mono-glucosilación; y un portador farmacéuticamente aceptable, en donde luego de la introducción del polipéptido HA mono-glucosilado en un sujeto, el polipéptido induce al sujeto a producir anticuerpos que se unen a la virus de la gripe.

[0037] En algunos aspectos, la introducción del polipéptido HA mono-glucosilado en el sujeto induce al sujeto a producir anticuerpos que neutralizan virus de la gripe tanto aviar como estacional.

[0038] En una incorporación, la hemaglutinina mono-glucosilada del virus de la gripe comprende un polipéptido HA H1 (Brisbane) estacional y luego de la introducción del polipéptido HA mono-glucosilado en un sujeto, el polipéptido HA H1 (Brisbane) induce al sujeto a producir anticuerpos que neutralizan el virus de la gripe NIBRG-121 (cepa de vacuna A (H1N1) pandemia 2009).

[0039] En otra incorporación, la hemaglutinina mono-glucosilada del virus de la gripe comprende un polipéptido NIBRG-121 (cepa de vacuna A(H1N1) pandemia 2009) y, luego de introducción del polipéptido HA mono-glucosilado en un sujeto, el polipéptido NIBRG-121 (cepa de vacuna A(H1N1) pandemia 2009) induce al sujeto a producir anticuerpos que neutralizan el virus de la gripe HA H1 (Brisbane) estacional.

[0040] En algunos aspectos, la vacuna incluye asimismo un coadyuvante, el cual puede seleccionarse de hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, los dos hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, coadyuvante incompleto de Freund (IFA - *incomplete Freund's adjuvant*), escualeno, escualano, alumbre, y MF59.

[0041] La invención se refiere a métodos para inmunizar un mamífero

contra una infección respiratoria vírica, método que comprende: administrar al mamífero, susceptible a infección por el virus respiratorio, una vacuna que contiene un polipéptido inmunógeno que incluye una glucoproteína vírica desglucosilada a un estado de mono-, di-, o tri-glucosilación, en donde la vacuna es capaz de suscitar una respuesta inmunitaria contra el virus respiratorio. En algunas incorporaciones, el virus respiratorio es un virus de la gripe y la glucoproteína vírica es hemaglutinina (HA). La vacuna puede administrarse mediante administración parenteral, medios de inhalación, por vía intranasal y, a veces, profilácticamente.

[0042] En algunos aspectos, la vacuna suscita una respuesta inmunitaria contra cepas del virus de la gripe que son diferentes de la cepa del virus de la gripe del cual se selecciona la glucoproteína vírica desglucosilada. En algunas incorporaciones, la glucoproteína vírica desglucosilada es una hemaglutinina (HA) de la gripe mono-glucosilada.

[0043] La presente invención provee vacunas efectivas contra el virus de la gripe A. En una incorporación, la vacuna incluye un péptido o polipéptido que imita funcionalmente un epítipo de neutralización de una molécula descrita en esta especificación. En otra incorporación, la vacuna, que es efectiva contra un antígeno vírico, incluye un péptido o polipéptido que imita funcionalmente un epítipo de neutralización de una molécula descrita en esta especificación. En una incorporación, el antígeno vírico es de un virus de la gripe o un virus VIH-1 o VIH-2, o un flavivirus, tal como el virus del dengue o el virus de la hepatitis C.

[0044] En otra incorporación, la vacuna es una vacuna efectiva contra el virus de la gripe A, que incluye un péptido o polipéptido que imita funcionalmente un epítipo de neutralización de una molécula descrita en esta especificación. En una incorporación, la molécula es un anticuerpo. En otra incorporación, el anticuerpo une un antígeno HA. En una otra incorporación, el antígeno HA es un subtipo H5. En una otra incorporación,

el antígeno HA es un subtipo H1. En una otra incorporación, el antígeno se despliega en la superficie del virus de la gripe A. En una otra incorporación, el péptido o polipéptido incluye determinantes antigénicos que suscitan anticuerpos neutralizantes.

[0045] Estos y otros aspectos se harán evidentes a partir de la siguiente descripción de la incorporación preferida, tomada conjuntamente con los siguientes dibujos, aunque pueden realizarse variaciones y modificaciones sin apartarse del espíritu y el ámbito de los novedosos conceptos de la divulgación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0046] Los siguientes dibujos forman parte de la presente especificación y se incluyen para mostrar con más detalle ciertos aspectos de la presente divulgación, cuyas invenciones pueden entenderse mejor por referencia a uno o más de estos dibujos, en combinación con la descripción detallada de incorporaciones específicas presentadas en esta especificación.

[0047] Figuras 1A-1C muestran vistas generales esquemáticas y espectros de dicroísmo circular de HAs con diferentes glucosilaciones. (Fig. 1A) Cuatro variantes de proteínas HA con diferentes glucosilaciones: HA_{fg}, HA (una secuencia de consenso (Chen MW, et al. (2008) Proc Natl Acad Sci USA 105:13538-13543) expresada en células HEK293E con los N-glicanos típicos tipo complejo); HA_{ds}, HA tratada con NA, resultante en la eliminación de ácidos siálicos de HA_{fg}; HA_{hm}, HA expresada en células HEK293S GnTI- con los N-glicanos tipo alta manosa; y HA_{mg}, HA tratada con Endo H con GlcNAc únicamente en sus sitios de N-glucosilación. (Fig. 1B) Representación de la estructura de HA_{fg}, HA_{ds}, HA_{hm}, y HA_{mg} con diferentes N-glicanos adheridos en sus sitios de N-glucosilación. Las estructuras proteínicas se crean con Protein Data Bank ID code 2FK0 (Viet04 HA), en color gris, y los glicanos N-enlazados se despliegan en

verde. Todos los N-glicanos se modelan por GlyProt (Bohne-Lang A, et al. (2005) Nucleic Acids Res 33:W214-W219), y las gráficas se generan por PyMOL (www.pymol.org). (Fig. 1C) Espectros de dicroísmo circular de HA_{fg}, HA_{ds}, HA_{hm}, y HA_{mg} demuestran que las estructuras secundarias de las cuatro proteínas HA con diferentes glucosilaciones son similares.

[0048] Figs. 2A-2B muestran análisis de microarreglo de glicanos de HA con diferentes glucosilaciones. (Fig. 2A) Se muestra la identificación ("*profiling*") del microarreglo de glicanos de variantes HA HA_{fg}, HA_{ds}, HA_{hm}, y HA_{mg}. Los enlaces relacionados de glicanos se agruparon por color, predominantemente 17 sialósidos α 2,3 (amarillo) o 7 sialósidos α 2,6 (azul). Las estructuras de glicanos en el arreglo se indican en Fig. 2B. Las constantes de asociación de variantes HA HA_{fg}, HA_{ds}, HA_{hm}, y HA_{mg} se muestran con valores de $K_{A,surf}$ de variantes HA en respuesta a sialósidos α 2,3 1-15.

[0049] Fig. 3 muestra análisis de alineamiento de secuencias de Brisbane H1, California H1, H3 y H5 de HAs recientes H1, H3, y H5 desde 2000. La HA de la gripe estacional es de A/Brisbane/59/2007. La HA de la gripe pandémica es de A/California/07/2009. H5 es de A/Vietnam/1203/2004. H3 es de A/Brisbane/10/2007. Los sitios de N-glucosilación en HA H5 se muestran en una casilla roja. La comparación revela similaridad entre HAs H1 y H5 en sus posiciones de N-glucosilación, mientras que H3 tiene posiciones de glucosilación menos conservadas y difiere de H1 y H5.

[0050] Figs. 4A-4F muestran las contribuciones de energía de unión de azúcares o modificaciones de interacciones de glicano HA en respuesta a HAs con diferentes glucosilaciones. Estos valores se obtuvieron por sustracción de valores ΔG del glicano de referencia indicado (resaltados en casillas rojas; véase Tabla S3). (Fig. 4A) Glicanos 2, 3, 6, y 8-10 poseen la misma cadena principal del disacárido glicano 1 pero sólo difieren en el tercer azúcar del extremo no reductor. Los valores de $\Delta\Delta G$ se calculan para

demostrar la diferencia de energía de unión cambiando los terceros azúcares. (Fig. 4B) Glicanos 10-12 y 15 poseen la misma cadena principal del disacárido glicano 8 pero difieren alargando la estructura del azúcar linealmente o agregando un azúcar ramificado. (Fig. 4C) Glicanos 4 y 5 poseen la misma cadena principal del trisacárido glicano 3 pero difieren por la fucosa ramificada o el grupo sulfato en la tercera posición del extremo no reductor. (Fig. 4D) Glicanos 6 y 7 difieren en el grupo sulfato en la tercera posición del extremo no reductor de glicano 7. (Fig. 4E) Glicanos 13 y 14 son sialósidos $\alpha 2,3$ biantenarios pero difieren en el cambio del azúcar interno. (Fig. 4F) Glicanos 16 y 17 y sialósidos $\alpha 2,6$ (Nos. 21-27) muestran poca o ninguna unión a HA.

[0051] Figs. 5A-5D muestran una comparación de HA_{fg} y HA_{mg} como vacuna. (Fig. 5A) Se analizan las uniones entre antisueros de HA_{fg} y HA_{mg}, y varias HAs utilizando ELISA. En comparación con el antisuero de HA_{fg}, el antisuero de HA_{mg} muestra una mejor unión H5 (Vietnam 1194/2004 y CHA5). Adicionalmente, el suero de HA_{mg} se une también a H1 (California 07/2009 y WSN). (Fig. 5B) Microneutralización del virus H5N1 (NIBRG-14) con antisueros de HA_{fg} y HA_{mg}. En comparación con el antisuero de HA_{fg}, el antisuero de HA_{mg} muestra una mejor actividad neutralizante contra la infección por el virus de la gripe a células MDCK ($P < 0.0001$). (Fig. 5C) Protección de la vacuna contra la exposición de dosis letal del virus H5N1. Ratones BALB/c se inmunizaron con dos inyecciones de la vacuna de la proteína HA HA_{fg}, HA_{mg}, y PBS de control. Los ratones inmunizados se expusieron intranasalmente con una dosis letal del virus H5N1 (NIBRG-14). Luego de la exposición, se registró la supervivencia durante 14 días. (Fig. 5D) La unión de antisuero de conejo de HA_{mg} con diferentes HAs mediante ELISA. El antisuero de conejo contra HA_{mg} demostró una fuerte unión a H5 (CHA5 y Vietnam/1194). Además, se observaron asimismo interacciones con H5 (Anhui e ID5/2005) y H1 (Nueva Caledonia /1999).

[0052] Figuras 6A-6C muestran la construcción de la proteína HA H5, la purificación, y el análisis de cromatografía de filtración en gel. (Fig. 6A) El ADN que codifica el ectodominio de HA con alternación del sitio de escisión se clonó en el vector de expresión mamífero, pTT (Durocher Y, et al. (2002) *Nucleic Acids Res* 30:E9), para permitir la secreción eficiente de proteínas HA de cultivos de células HEK293. El sitio de escisión de proteasa original de la HA se mutó a PQRERG para evitar el procesamiento de la HA0 en HA1 y HA2. Para estabilizar la conformación trimérica de las proteínas HA, la secuencia "foldon", que es fragmento trimerizante del bacteriófago, se manipuló por técnicas de ingeniería genética en el constructo del plásmido, y se agregó además una polihistidina (His-tag) en el término COOH para efectos de purificación. La expresión de las proteínas HA se llevó a cabo por transfección transitoria con el vector de expresión. (Fig. 6B) Las proteínas HA purificadas se analizaron mediante SDS/PAGE. M indica marcador. Calle 1: HA_{fg}, la HA purificada de células 293E; calle 2: HA_{ds}, HA_{fg} digerida por NA; calle 3: HA_{hm}, la HA purificada de células 293S (Reeves PJ, et al. (2002) *Proc Natl Acad Sci USA* 99:13419-13424); calle 4: HA_{mg}, HA_{hm} digerida por Endo H. (Fig. 6C) Las proteínas purificadas de HA se analizaron mediante cromatografía de filtración en gel. El pico eluido mostró que el trímero HA_{fg} >200 kDa (línea roja), el trímero HA_{ds} >200 kDa (línea negra), el trímero HA_{hm} >200 kDa (línea azul), y el trímero HA_{mg} >180 kDa después de la filtración en gel (línea verde). La figura presenta perfiles de elución superpuestos de proteínas HA recubiertas con marcador de proteína (línea discontinua).

[0053] Figs. 7A-7C muestran análisis de espectrometría de masas de N-glicanos permetilados de diferentes proteínas HA. El análisis MS de N-glicanos permetilados de diferentes proteínas HA. (Fig. 7A) El perfil MALDI-MS mostró que los N-glicanos de HA expresada de HEK293E contienen estructuras N-glicano tipo complejo predominantemente nucleofucosiladas, biantenarias, triantenarias, y tetraantenarias, como se anotó para los principales picos detectados y listados en Tabla S1. La

asignación se basa en la composición, con tan sólo unas cuantas limitadas, verificadas adicionalmente mediante análisis MS/MS. El diferente grado de sialilación es una característica principal. (Fig. 7B) Con tratamiento de NA, todas las señales asignadas como N-glicanos sialilados (v.g., m/z 2605, 3054, 3503, 3864, 4226) ya no se detectaron, concomitantes con un aumento en las intensidades de señal para las estructuras triantenarias y tetraantenarias no sialiladas (m/z 2693, 3142), totalmente consistentes con la completa eliminación de los ácidos siálicos. (Fig. 7C) El perfil MALDI-MS de los N-glicanos derivados de HA expresada en la cepa HEK293S deficiente en GnTI mostró predominantemente una señal correspondiente a Man5GlcNAc2 a m/z 1579, junto con picos menores de N-glicanos tipo alta manosa, recortados en forma incompleta (m/z 1783 a 2396; Hex6HexNAc2-Hex9HexNAc2) en la ruta de glucosilación.

[0054] Figs. 8A-8D muestran análisis MALDI-TOF de variantes HA. Los pesos moleculares de (Fig. 8A) HA_{fg} es 75 186.343, (Fig. 8B) HA_{ds} es 75290.023, (Fig. 8C) HA_{hm} es 693 14.645 y (Fig. 8D) HA_{mg} es 63314.761.

[0055] Fig. 9 muestra asignaciones de los principales iones moleculares observadas en espectros MALDI de N-glicanos permetilados de trímeros HA. ND indica no determinado.

[0056] Fig. 10 muestra los $\Delta\Delta G$ de variantes glucosiladas HA en respuesta a sialósidos α 2,3 1-15. Los valores representan $\Delta\Delta G$, kcal/mol. Las entradas en la columna más a la izquierda se obtuvieron por sustracción de los valores ΔG de la última HA de la primera HA (v.g., $\Delta\Delta G (HA_{fg} \rightarrow HA_{ds}) = \Delta G(HA_{ds}) - \Delta G(HA_{fg})$). ND indica no determinado.

[0057] Fig. 11 muestra diferencias en variaciones de energía libre de unión entre diferentes ligandos sialósidos en respuesta a variantes HA. Los valores representan $\Delta\Delta G$, kcal/mol. Las entradas en la columna más a la izquierda se obtuvieron por sustracción de los valores ΔG de la última HA

de la primera HA (v.g., $\Delta\Delta G (1 \rightarrow 2) = \Delta G(2) - \Delta G(1)$). ND indica no determinado.

[0058] Fig. 12 muestra la capacidad de los antisueros generados de HA H5 completamente glucosilada, alta manosa y monoglucosilada, de inhibir la transducción del virus pseudotipado Vietnam 1203 HA en células HEK293. Los dos antisueros HA alta manosa y mono-glucosilada inhiben la entrada del virus, pero los antisueros HA completamente glucosilada no la inhiben.

[0059] Figs. 13A-13B muestran los resultados del análisis de hemaglutinación con antisueros HA_{fg} y HA_{mg} de conejo. Fig. 13A muestra los resultados con antisueros H5 HA de consenso completamente glucosilada en análisis de hemaglutinación hacia H1, H3 y H5. Fig. 13B muestra los resultados con antisueros H5 HA monoglucosilada. Los antisueros H5 HA monoglucosilada no sólo despliegan buena actividad de la inhibición de hemaglutinación hacia H5, sino también hacia H1. La hemaglutinación H3 no es afectada por cualquiera de los dos antisueros.

[0060] Fig. 14 muestra que las estructuras proteínicas de H5 y H1 son más similares una a la otra (desviación cuadrática media (RMSD - *root mean square deviation*) de 0.9 Å), que a H3 (desviación cuadrática media (RMSD) de 2.5 Å).

[0061] Figs. 15A-15C muestran inhibición de NIBRG-121 (cepa de la vacuna A(H1N1) pandémica 2009) por antisueros generados utilizando HA H1 (Brisbane) mono-glucosilada como antígeno. Fig. 15A muestra inhibición de la capacidad del virus NIBRG-121 (cepa de la vacuna A (H1N1) pandémica 2009) de aglutinar glóbulos rojos. Fig. 15B muestra inhibición de la capacidad del virus NIBRG-121 (cepa de la vacuna A (H1N1) pandémica 2009) de infectar células MDCK. Figure 15C muestra protección de ratones BALB/c contra la infección por el virus de la gripe NIBRG-121 (cepa de la vacuna A (H1N1) pandémica 2009). Los antisueros

utilizados eran de ratones inmunizados con proteínas HA Brisbane (5 μ g), y el virus empleado para la exposición era NIBRG-121 (100x LD₅₀).

[0062] Figs. 16A-16C muestran inhibición de WSN (H1N1) 1933 por antisueros generados utilizando HA H1 (Brisbane) mono-glucosilada como antígeno. Fig. 16A muestra inhibición de la capacidad del virus WSN (H1N1) 1933 de aglutinar glóbulos rojos. Fig. 16B muestra inhibición de la capacidad del virus WSN (H1N1) 1933 de infectar células MDCK. Figura 16C muestra protección de ratones BALB/c contra la infección por el virus de la gripe WSN (H1N1) 1933. Los antisueros utilizados eran de ratones inmunizados con proteínas HA Brisbane (5 μ g) y el virus usado para la exposición era WSN (H1N1) 1933 (100x LD₅₀).

[0063] Figs. 17A-17C muestran inhibición de A/Puerto Rico/8/34 (H1N1):PR8 por antisueros generados utilizando HA H1 (Brisbane) mono-glucosilada como antígeno. Fig. 17A muestra inhibición de la capacidad del virus PR8 de aglutinar glóbulos rojos. Fig. 17B muestra inhibición de la capacidad del virus PR8 de infectar células MDCK. Figura 17C muestra protección de ratones BALB/c contra la infección por el virus de la gripe PR8. Los antisueros utilizados eran de ratones inmunizados con proteínas HA Brisbane (5 μ g) y el virus usado para la prueba de provocación era PR8 (100x LD₅₀).

[0064] Figs. 18A-18B muestran inhibición de WSN (H1N1) por antisueros generados utilizando la cepa de la vacuna H1 mono-glucosilada (A(H1N1) pandémica 2009); mostrada en figura como HA California/2009) como antígeno. Fig. 18A muestra inhibición de la capacidad del virus WSN (H1N1) de aglutinar glóbulos rojos. Fig. 18B muestra inhibición de la capacidad del virus WSN (H1N1) de infectar células MDCK.

[0065] Fig. 19 muestra la comparación estructural de los sitios de glucosilación en la proteína HA H1.

[0066] Fig. 20 muestra dímeros de la glucoproteína E de envoltura del virus tipo 3 del dengue en forma completamente glucosilada (Fig. 20A) y en forma mono-glucosilada (Fig. 20B). Se crearon modelos a partir de PDB código 1UZG, con 4 posibles *N*-glicanos tipo complejo con el servidor GlyProt.

[0067] Fig. 21 muestra trímeros de la glucoproteína gp120 de envoltura del virus de la inmunodeficiencia humana en forma completamente glucosilada (Fig. 21 A) y en forma mono-glucosilada (Fig. 21B). Se crearon modelos a partir de PDB código 2BF1, con 13 posibles *N*-glicanos tipo complejo por monómero.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0068] En la siguiente descripción detallada de incorporaciones de la presente divulgación se hace referencia a los dibujos acompañantes en los cuales referencias similares indican elementos similares, y en los que se muestran a modo de ilustración incorporaciones específicas en las que puede ponerse en práctica la presente divulgación. Estas incorporaciones se describen con suficiente detalle para permitirles a las personas expertas en el arte poner en práctica la presente divulgación, y hay que entender que pueden utilizarse otras incorporaciones y que pueden introducirse cambios lógicos, estructurales, funcionales, y otros cambios, sin apartarse del ámbito de la presente divulgación. En consecuencia, la siguiente descripción detallada no tiene que tomarse en un sentido limitante.

[0069] La hemaglutinina (HA) del virus de la gripe es una proteína transmembrana homotrimérica con un ectodominio compuesto de una cabeza globular y una región de cola. Las dos regiones llevan oligosacáridos *N*-enlazados, cuya biosíntesis sigue las rutas generales de la *N*-glucosilación. Las propiedades funcionales de HA están afectadas por

glucosilación en sitios específicos. Los carbohidratos alrededor de los epítopos del péptido antigénico interfieren con el acceso de anticuerpos, y este efecto puede resultar en una deriva antigénica del virus de la gripe. Estudios previos en HAs revelaron igualmente que las secuencias peptídicas con glucosilación están altamente conservadas, y la especificidad de unión a receptor HA estaba afectada por la ausencia de una cadena de glicano complejo cerca del sitio de unión a receptor. Adicionalmente, la activación proteolítica de HA se moduló igualmente por los glicanos cerca del sitio de escisión para influenciar la ineffectividad del virus de la gripe. Las extensivas variaciones en estructura y número de los sitios de glucosilación en la región de la cabeza se han mostrado entre diferentes subtipos de los virus de la gripe A, mientras que los oligosacáridos de la cola eran más conservados y requeridos para actividad de fusión. Todos estos hallazgos han indicado la importancia de la glucosilación de HA sobre su actividad.

[0070] La transmisión vírica comienza con una interacción crítica entre la glucoproteína hemaglutinina (HA), que está en la envoltura vírica de glicanos de la gripe y glicanos que contienen ácido siálico (SA - *sialic acid*), que se encuentran en la superficie de la célula anfitriona. Para aclarar el papel de la glucosilación de HA en esta importante interacción, se prepararon varias glicoformas definidas de HA, y se estudiaron su afinidad y especificidad de unión utilizando un microarreglo SA sintético. El truncado de las estructuras de N-glicano en HA aumentó las afinidades de unión SA disminuyendo al mismo tiempo la especificidad hacia ligandos SA dispares. La contribución de cada monosacárido y grupo sulfato dentro de las estructuras de ligandos SA a la energía de unión de HA se analizó cuantitativamente. Se descubrió que el grupo sulfato agrega casi 100 veces (2.04 kcal/mol) en energía de unión a HA completamente glucosilada, y así lo hace el glicano biantenarico a la glicoforma HA monoglucosilada. Anticuerpos suscitados contra la proteína HA que lleva únicamente una sola GlcNAc N-enlazada en cada sitio de glucosilación mostraron una mejor afinidad de unión y actividad de neutralización contra subtipos de la gripe

que las HAs completamente glucosiladas provocadas. Por consiguiente, la eliminación de glicanos estructuralmente no esenciales en glucoproteínas de superficie víricas es un enfoque general y muy efectivo para el diseño de vacunas contra el virus de la gripe y otros virus.

[0071] A menos que se defina lo contrario, los términos técnicos y científicos utilizados en esta especificación tienen en mismo significado que se entiende comúnmente por una persona de habilidad ordinaria en el arte al cual pertenece esta invención. Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2nd ed., J. Wiley & Sons (New York, N.Y. 1994), le proporciona a un experto en el arte una orientación general con respecto a muchos de los términos utilizados en la presente solicitud.

[0072] Un experto en el arte reconocerá muchos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en esta especificación, que podrían usarse en la práctica de la presente invención. Por supuesto, la presente invención no se limita en ningún modo a los métodos y materiales descritos. Para los propósitos de la presente invención, los siguientes términos se describen a continuación.

[0073] Los términos "subtipo de la gripe A" o "subtipo del virus de la gripe A" se usan indistintamente, y se refieren a variantes del virus de la gripe A que se caracterizan por una proteína de superficie vírica, hemaglutinina (H), y, en consecuencia, se identifican por un número H, tales como, por ejemplo, H1, H3, y H5. Adicionalmente, los subtipos pueden caracterizarse también por una proteína de superficie vírica neuraminidasa (N), indicada por un número N, tal como, por ejemplo, N1 y N2. Como tal, un subtipo puede designarse por ambos números H y N, tales como, por ejemplo, H1N1, H5N1, y H5N2. Los términos incluyen específicamente todas las cepas (incluidas las cepas extintas) dentro de cada subtipo, las cuales resultan usualmente de mutaciones y exhiben perfiles patógenos diferentes. Tales cepas se designarán igualmente como varios "aislados" de un subtipo

vírico, incluyendo todos los aislados pasados, presentes y futuros. Por consiguiente, en este contexto, los términos "cepa" y "aislado" se utilizan indistintamente. Los subtipos contienen antígenos basados en un virus de la gripe A. Los antígenos pueden basarse en una proteína de superficie vírica hemaglutinina y pueden designarse como "antígeno HA". En algunos casos, tales antígenos se basan en la proteína de un subtipo particular, tal como, por ejemplo, un subtipo H1 y un subtipo H5, que pueden designarse un antígeno H1 y un antígeno H5, respectivamente.

[0074] Tal como se emplea en la presente divulgación, el término proteína "desglucosilada" o "parcialmente glucosilada" denota una proteína que tiene uno o más azúcares eliminados de la estructura glicano de una instancia completamente glucosilada de la proteína y en la cual la proteína conserva sustancialmente su conformación/plegamiento nativo. Una proteína "desglucosilada" incluye una proteína parcialmente glucosilada en la cual el proceso de desglucosilación deja una monoglucosilación, una diglucosilación o una triglucosilación en uno o más sitios de glucosilación presentes en la glucoproteína.

[0075] Una proteína "parcialmente glucosilada" incluye una proteína "desglucosilada" en la cual se conservan uno o más azúcares en cada sitio de glucosilación, y cada sitio de glucosilación parcial contiene una estructura glicano más pequeña (que contiene menos unidades de azúcar), comparada con el sitio en una instancia completamente glucosilada de la glucoproteína, y la proteína parcialmente glucosilada conserva sustancialmente su conformación/plegamiento nativo. Una proteína "parcialmente glucosilada" se genera por desglucosilación parcial de la estructura glicano de por lo menos un sitio de glucosilación de una instancia completamente glucosilada de la glucoproteína. Una proteína "parcialmente glucosilada" se genera igualmente introduciendo glucosilación en un sitio no glucosilado de una proteína, de tal manera que la secuencia de glucosilación agregada es más pequeña que la estructura glicano en ese sitio

en una instancia completamente glucosilada de la glucoproteína. Una proteína "parcialmente glucosilada" se genera asimismo sintetizando una secuencia de glucoproteína vírica, o un fragmento de la misma, introduciendo unidades de aminoácido glucosiladas (v.g., fracciones GlcNAc-Arginina) en los sitios de glucosilación de la secuencia, de manera que la estructura glicano agregada sea menor que la estructura glicano en ese sitio en una instancia completamente glucosilada de la glucoproteína.

[0076] Los términos "ácido nucleico" y "polinucleótido" se emplean indistintamente en esta especificación para referirse a ARN, ADN mono- o bicatenario, o polímeros mixtos. Los polinucleótidos pueden incluir secuencias genómicas, extra-genómicas y secuencias plasmídicas, y segmentos de genes más pequeños manipulados por técnicas de ingeniería genética que expresan, o pueden adaptarse para expresar, polipéptidos.

[0077] Un "ácido nucleico aislado" es un ácido nucleico que está sustancialmente separado de otras secuencias de ADN del genoma, así como proteínas o complejos tales como ribosomas y polimerasas, que acompañan naturalmente a una secuencia nativa. El término engloba una secuencia de ácido nucleico que se ha sacado de su entorno de ocurrencia natural, e incluye aislados de ADN recombinante o clonado y análogos sintetizados químicamente o análogos sintetizados biológicamente por sistemas heterólogos. Un ácido nucleico sustancialmente puro incluye formas aisladas del ácido nucleico. Desde luego, esto se refiere al ácido nucleico como aislado originalmente y no excluye genes o secuencias agregadas posteriormente al ácido nucleico aislado por la mano del hombre.

[0078] El término "polipéptido" se emplea en su significado convencional, *es decir*, como una secuencia de aminoácidos. Los polipéptidos no se limitan a una longitud específica del producto. Péptidos, oligopéptidos, y proteínas se incluyen dentro de la definición de polipéptido, y tales términos pueden emplearse indistintamente en esta especificación, a menos que se

indique específicamente lo contrario. Este término tampoco se refiere a, o excluye modificaciones pos-expresión del polipéptido, por ejemplo, glucosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones y similares, así como otras modificaciones conocidas en el arte, tanto de ocurrencia natural como de ocurrencia no natural. Un polipéptido puede ser una proteína entera, o una subsecuencia de la misma. Polipéptidos particulares de interés en el contexto de esta invención son subsecuencias de aminoácidos que comprenden regiones determinantes de complementariedad (CDRs) y que son capaces de unir un antígeno o una célula infectada por VIH.

[0079] Un "polipéptido aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. En incorporaciones preferidas, el polipéptido aislado se purificará (1) a más del 95% en peso del polipéptido como determinado por el método de Lowry, y muy preferiblemente más del 99% en peso, (2) a un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el empleo de un secuenciador de vaso giratorio, o (3) a una homogeneidad mediante electroforesis sobre gel SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) bajo condiciones reductoras o no reductoras, utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción de plata. Un polipéptido aislado incluye el polipéptido *in situ* dentro de células recombinantes ya que por lo menos un componente del entorno natural del polipéptido no estará presente. Normalmente, sin embargo, un polipéptido aislado se preparará mediante por lo menos un paso de purificación.

[0080] Un polinucleótido de "secuencia nativa" es uno que tiene la misma secuencia nucleotídica que un polinucleótido derivado de la naturaleza. Un polipéptido de "secuencia nativa" es uno que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un polipéptido (v.g., anticuerpo) derivado de la naturaleza (v.g., de cualquier especie). Tales polinucleótidos y polipéptidos de secuencia nativa pueden aislarse de la naturaleza o pueden producirse por medios recombinantes o sintéticos.

[0081] Una "variante" de polinucleótido, tal como el término se emplea en esta especificación, es un polinucleótido que típicamente difiere de un polinucleótido, divulgado específicamente en esta especificación, en una o más sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones. Tales variantes pueden ocurrir naturalmente o generarse sintéticamente, por ejemplo, modificando una o más de las secuencias polinucleotídicas de la invención y evaluando una o más actividades biológicas del polipéptido, como se describe en esta especificación, y/o utilizando cualquiera de un número de técnicas bien conocidas en el arte.

[0082] Una "variante" de polipéptido, tal como el término se emplea en esta especificación, es un polipéptido que típicamente difiere de un polipéptido, divulgado específicamente en esta especificación, en una o más sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones. Tales variantes pueden ocurrir naturalmente o generarse sintéticamente, por ejemplo, modificando una o más de las secuencias polipeptídicas anteriores de la invención y evaluando una o más actividades biológicas del polipéptido, como se describe en esta especificación, y/o utilizando cualquiera de un número de técnicas bien conocidas en el arte.

[0083] Pueden hacerse modificaciones en la estructura de los polinucleótidos y polipéptidos de la presente invención y obtener aún una molécula funcional que codifica una variante o polipéptido derivado con características deseables. Cuando se desea alterar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido para crear una variante o porción equivalente, o incluso mejorada, de un polipéptido de la invención, una persona experta en el arte cambiará normalmente uno o más de los codones de la secuencia de ADN codificante.

[0084] Por ejemplo, ciertos aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos en una estructura proteínica sin pérdida apreciable de su

capacidad de unir otros polipéptidos (v.g., antígenos) o células. Puesto que es la capacidad de unión y la naturaleza de una proteína la que define la actividad funcional biológica de esa proteína, ciertas sustituciones de secuencias de aminoácidos pueden hacerse en una secuencia proteínica, y, su secuencia codificante de ADN subyacente, y obtener sin embargo una proteína con propiedades similares. Se contempla por lo tanto que pueden introducirse varios cambios en las secuencias peptídicas de las composiciones divulgadas, o secuencias de ADN correspondientes que codifican los citados péptidos, sin pérdida apreciable de su utilidad o actividad biológica.

[0085] Al introducir tales cambios, puede considerarse el índice hidropático de los aminoácidos. La importancia del índice hidropático de los aminoácidos en conferir una función biológica interactiva a una proteína se entiende generalmente en el arte (Kyte and Doolittle, 1982). Se acepta que el carácter hidropático relativo del aminoácido contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, lo que, a su vez, define la interacción de la proteína con otras moléculas, por ejemplo, enzimas, sustratos, receptores, ADN, anticuerpos, antígenos, y similares. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático sobre la base de su hidrofobicidad y características de carga (Kyte and Doolittle, 1982). Estos valores son: isoleucina (+4.5); valina (+4.2); leucina (+3.8); fenilalanina (+2.8); cisteína/cistina (+2.5); metionina (+1.9); alanina (+1.8); glicina (-0.4); treonina (-0.7); serine (-0.8); triptófano (-0.9); tirosina (-1.3); prolina (-1.6); histidina (-3.2); glutamato (-3.5); glutamina (-3.5); aspartato (-3.5); asparagina (-3.5); lisina (-3.9); y arginina (-4.5). Se sabe en el arte que ciertos aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos que tienen un índice hidropático similar o puntaje y resultar todavía en una proteína con actividad biológica similar, *es decir*, obtener una proteína biológica, funcionalmente equivalente. Al introducir tales cambios, la substitución de aminoácidos, cuyos índices hidropáticos están dentro de ± 2 , es preferida, de aquellos dentro de ± 1 es particularmente preferida, y de aquellos dentro de

± 0.5 es aún más particularmente preferida.

[0086] Se entiende asimismo en el arte que la sustitución de aminoácidos similares puede hacerse efectivamente sobre la base de la hidrofiliidad. La Patente de los Estados Unidos 4,554,101 afirma que la máxima hidrofiliidad media local de una proteína, regida por la hidrofiliidad de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con una propiedad biológica de la proteína. Como se detalla en la Patente de los Estados Unidos 4,554,101, los siguientes valores de hidrofiliidad se han asignado a residuos de aminoácido: arginina (+3.0); lisina (+3.0); aspartato (+3.0 $\pm$ 1); glutamato (+3.0 $\pm$ 1); serina (+0.3); asparagina (+0.2); glutamina (+0.2); glicina (0); treonina (-0.4); prolina (-0.5 $\pm$ 1); alanina (-0.5); histidina (-0.5); cisteína (-1.0); metionina (-1.3); valina (-1.5); leucina (-1.8); isoleucina (-1.8); tirosina (-2.3); fenilalanina (-2.5); triptófano (-3.4). Se entiende que un aminoácido puede sustituirse por otro que tenga un valor de hidrofiliidad similar y obtener una proteína biológicamente equivalente y, en particular, una proteína inmunológicamente equivalente. En tales cambios, la sustitución de aminoácidos, cuyos valores de hidrofiliidad están dentro de ± 2 , es preferida, de aquellos dentro de ± 1 es particularmente preferida y, de aquellos dentro de ± 0.5 es aún más particularmente preferida.

[0087] Según lo descrito más arriba, por consiguiente, las sustituciones de aminoácidos se basan por lo general en la similitud relativa de los radicales de cadena lateral del aminoácido, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofiliidad, carga, tamaño, y similares. Sustituciones ejemplares, que toman en consideración varias de las características anteriores, son bien conocidas por los expertos en el arte e incluyen: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina.

[0088] Los polipéptidos pueden incluir una secuencia señal (o líder) en el extremo N-terminal de la proteína, la cual dirige co-translacional o pos-

translacionalmente la transferencia de la proteína. Asimismo el polipéptido puede conjugarse a un conector u otra secuencia para facilidad de síntesis, purificación o identificación del polipéptido (v.g., poli-His), o para mejorar la unión del polipéptido a un soporte sólido.

[0089] Normalmente la glucosilación de polipéptidos es N-enlazada o O-enlazada. N-enlazada se refiere a la adhesión de la fracción carbohidrato a la cadena lateral de un residuo asparagina. Una "sequon" es una secuencia de tres aminoácidos consecutivos en una proteína que pueden servir como el sitio de adhesión a un polisacárido (azúcar) denominado un glicano N-enlazado. Esto es, un polisacárido enlazado a la proteína mediante el átomo de nitrógeno en la cadena lateral de asparagina (Asn). Una sequon es Asn-X_{aa}-Ser o Asn-X_{aa}-Thr, en donde X_{aa} es cualquier aminoácido excepto prolina. Por consiguiente, la presencia de una cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio potencial de glucosilación. La glucosilación O-enlazada se refiere a la adhesión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa a un hidroxiaminoácido, muy comúnmente serina o treonina, aunque pueden utilizarse también 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina. Aunque el sequon Asn-X-Ser/Thr es absolutamente requerido para la adhesión de oligosacáridos N-enlazados a una glucoproteína (Marshall RD, *Biochemical Society Symposia* **40**, 17-26 1974), su presencia no siempre resulta en glucosilación y algunos sequons en glucoproteínas pueden permanecer no glucosilados. (Curling EM, *et al*, *Biochemical Journal* **272**, 333-337 1990).

[0090] El microarreglo de glicanos es una poderosa herramienta para investigar interacciones carbohidrato-proteína y proporciona una nueva plataforma para el subtipado del virus de la gripe (Blixt O, *et al*. (2004) *Proc Natl Acad Sci USA* 101:17033-17038; Chandrasekaran A, *et al*. (2008) *Nat Biotechnol* 26:107-113; Liang PH, *et al*. (2007) *J Am Chem Soc* 129:11177-11184; Stevens J, *et al*. (2008) *J Mol Biol* 381:1382-1394). Éstas imitan los glicanos en la superficie de la célula para exhibir

interacciones multivalentes con alta afinidad y especificidad. Utilizando esta tecnología, se llevó a cabo la caracterización de la especificidad del receptor de varias HAs nativas y mutantes, proporcionando una nueva plataforma para diferenciar subtipos del virus de la gripe.

[0091] Aunque un método poderoso, entender las interacciones HA-glicano mediante análisis de arreglo de glicanos se ha complicado por dos problemas: en primer lugar, la especificidad de unión HA se afecta por el arreglo espacial y la composición de los glicanos ordenados y el método de detección de unión utilizado (Srinivasan A, et al. (2008) Proc Natl Acad Sci USA 105:2800-2805). En segundo, los cambios en la secuencia peptídica en o cerca de los sitios de glucosilación pueden alterar la estructura 3D de las HA's y, por consiguiente, la especificidad y afinidad de unión a receptor. Por supuesto, HAs de diferentes subtipos H5N1 tienen diferentes patrones de unión a glicano (Stevens J, et al. (2008) J Mol Biol 381:1382-1394). La mutagénesis de los sitios de glucosilación en H1 y H3 se ha estudiado en el sistema vírico entero (Chandrasekaran A, et al. (2008) Nat Biotechnol 26:107-113; Deom CM, et al. (1986) Proc Natl Acad Sci USA 83:3771-3775). Sin embargo, se desconoce cómo los cambios en la glucosilación afectan la especificidad y afinidad de unión a receptor, especialmente con respecto a la HA H5N1 más patógena. Para abordar estos problemas, se desarrolló un método de análisis cuantitativo de microarreglo de glicanos para superar las limitaciones de los experimentos tradicionales de unión HA.

[0092] Estudios previos han utilizado HA de expresión de células de insecto (Chandrasekaran A, et al. (2008) Nat Biotechnol 26:107-113). Sin embargo, la glucosilación en células de insecto difiere de las células mamíferas, siendo una marcada diferencia que N-glicanos tipo complejo que terminan en galactosa y ácido siálico no se producen en células de insecto.

Variantes glucosiladas de HA expresadas de células humanas

[0093] Para abordar la forma en que los cambios en glucosilación afectan la especificidad y afinidad de unión a receptor en células humanas, se prepararon un microarreglo de glicanos que contenía análogos estructurales extensivos del ligando de unión a HA, y varias glicoformas definidas de HA utilizando la secuencia de consenso HA H5N1 de la gripe (Chen MW, et al. (2008) Proc Natl Acad Sci USA 105:13538-13543) para análisis de unión cuantitativo.

[0094] Los codones de CHA5 se optimizaron para expresión utilizando codones humanos. Como se muestra en Tabla 1, el sitio de escisión de la proteasa vírica original PQRERRRKKRG (SEQ ID NO: 1) se mutó a PQRERG (SEQ ID NO: 2) con el fin de evitar que proteínas de la escisión enzimática formaran HA1 y HA2. La región transmembrana (residuos: 533-555) se reemplazó con los residuos adicionales LVPRGSPGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFLG**HHHHHHH** (SEQ ID NO: 3) en el término C del constructo HA, donde el sitio de escisión de trombina está en cursiva, la secuencia de trimerización foldon de fibrina del bacteriófago T4 está subrayada, y la His-tag está en negrita (Stevens J. et al. (2006) Science 312:404-410).

Tabla 1. Secuencia de consenso de hemaglutinina H5

Secuencia de aminoácidos de consenso HA H5 que muestra en negrita: secuencia señal; y subrayada: secuencia de trimerización y His-tag.				
<u>MEKIVLLFAIVSLVKSDQICIG</u> SHANNSTEQVDTIMEKNVTVTTHAQDILE 50				
KTHNGKLCDLGDGVKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFINVPEWSYIVEKAN 100				
PANDLCYPGDFNDYEELKHLLSRINHFEKIQIIPKSSWSSHEASSGVSSA 150				
CPYQGKSSFFRNVVWLIKKNSTYPTIKRSYNNNTNQEDLLVLWGIHHPNDA 200				
AEQTKLYQNPTTYISVGTSTLNQRLVPKIATRISKVNGQSGRMEFFWTILK 250				
PNDAINFESNGNFIAPEYAYKIVKKGDSTIMKSELEYGNCNTKCQTPMGA 300				
INSSMPFHNHPLTIGECPKYVKSNRLVLATGLRNSPQERERGLFGAIAGF 350				
IEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSGSYAADKESTQKAIDGVTNKVNSIIDKM 400				
NTQFEAVGREFNNLERRIENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMENERTLD 450				
FHDSNVKNLYDKVRLQLRDNAKELGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDY 500				
<u>PQYSEEARLKREEISGVDIRSLVPRGSPGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEW</u> 550				
<u>VLLSTFLGHHHHHH</u>				
(SEQ ID NO: 4)				
Secuencia nucleotídica de consenso HA H5				
1	ATGGAGAAGA	TCGTGCTGCT	GTTCCGCCATC	GTGAGCCTGG TGAAGAGCGA
51	CCAGATCTGC	ATCGGATCCC	ACGCCAACAA	CAGCACCGAG CAGGTGGACA
101	CCATCATGGA	GAAGAACGTG	ACCGTGACCC	ACGCCCAGGA CATCCTGGAG
151	AAGACCCACA	ACGGCAAGCT	GTGCGACCTG	GACGGCGTGA AGCCTCTGAT
201	CCTGAGAGAC	TGCAGCGTGG	CCGGCTGGCT	GCTGGGCAAC CCTATGTGCG
251	ACGAGTTCAT	CAACGTGCCT	GAGTGGAGCT	ACATCGTGGA GAAGGCCAAC
301	CCTGCCAACG	ACCTGTGCTA	CCCTGGCGAC	TTCAACGACT ACGAGGAGCT
351	GAAGCACCTG	CTGAGCAGAA	TCAACCACTT	CGAGAAGATC CAGATCATCC
401	CTAAGAGCAG	CTGGAGCAGC	CACGAGGCCA	GCAGCGGCGT GAGCAGCGCC
451	TGCCCTTACC	AGGGCAAGAG	CAGCTTCTTC	AGAAACGTGG TGTGGCTGAT
501	CAAGAAGAAC	AGCACCTACC	CTACCATCAA	GAGAAGCTAC AACAACACCA
551	ACCAGGAGGA	CCTGCTGGTG	CTGTGGGGCA	TCCACCACCC TAACGACGCC
601	GCCGAGCAGA	CCAAGCTGTA	CCAGAACCCT	ACCACCTACA TCAGCGTGGG
651	CACCAGCACC	CTGAACCAGA	GACTGGTGCC	TAAGATCGCC ACCAGAAGCA
701	AGGTGAACGG	CCAGAGCGGC	AGAATGGAGT	TCTTCTGGAC CATCCTGAAG
751	CCTAACGACG	CCATCAACTT	CGAGAGCAAC	GGCAACTTCA TCGCCCCTGA
801	GTACGCCTAC	AAGATCGTGA	AGAAGGGCGA	CAGCACCATC ATGAAGAGCG
851	AGCTGGAGTA	CGGCAACTGC	AACACCAAGT	GCCAGACCCC TATGGGCGCC

```

901 ATCAACAGCA GCATGCCTTT CCACAACATC CACCCTCTGA CCATCGGCGA
951 GTGCCCTAAG TACGTGAAGA GCAACAGACT GGTGCTGGCC ACCGGCCTGA
1001 GAAACAGCCC TCAGAGAGAG AGAGGCCTGT TCGGCGCCAT CGCCGGCTTC
1051 ATCGAGGGCG GCTGGCAGGG CATGGTGGAC GGCTGGTACG GCTACCACCA
1101 CAGCAACGAG CAGGGCAGCG GCTACGCCGC CGACAAGGAG AGCACCCAGA
1151 AGGCCATCGA CGGCGTGACC AACAAGGTGA ACAGCATCAT CGACAAGATG
1201 AACACCCAGT TCGAGGCCGT GGGCAGAGAG TTCAACAACC TGGAGAGAAG
1251 AATCGAGAAC CTGAACAAGA AGATGGAGGA CGGCTTCCTG GACGTGTGGA
1301 CCTACAACGC CGAGCTGCTG GTGCTGATGG AGAACGAGAG AACCTGGAC
1351 TTCCACGACA GCAACGTGAA GAACCTGTAC GACAAGGTGA GACTGCAGCT
1401 GAGAGACAAC GCCAAGGAGC TGGGCAACGG CTGCTTCGAG TTCTACCACA
1451 AGTGCGACAA CGAGTGCATG GAGAGCGTGA GAAACGGCAC CTACGACTAC
1501 CCTCAGTACA GCGAGGAGGC CAGACTGAAG AGAGAGGAGA TCAGCGGCGT
1551 GGATATCAGA TCTCTGGTGC CAAGAGGATC TCCAGGATCT GGATACATCC
1601 CAGAGGCTCC AAGAGATGGA CAAGCTTACG TGAGAAAGGA CGGAGAGTGG
1651 GTGCTGCTGT CTACTTTCCT GGGACACCAC CACCACCACC ACTAA
(SEQ ID NO: 5)

```

[0095] La secuencia de consenso H5 se utilizó para generar variantes glucosiladas de HA expresadas de células humanas HEK293. Para generar glucosilación tipo alta manosa (HA_{hm}), se emplearon células HEK293S, las cuales son deficientes en N-acetilglucosaminiltransferasa I (GnTI⁻). Con el fin de abordar además el efecto de la glucosilación de HA sobre la afinidad y especificidad de unión a receptor, se eliminaron sistemáticamente los azúcares en HA de los N-glicanos nativos tipo complejo (Fig 1A). Se eliminaron los residuos de ácido siálico de HA_{fg} mediante tratamiento de neuraminidasa (NA) para producir HA desialilada (HA_{ds}). Se utilizó endoglucosidasa H (Endo H) para truncar la totalidad de las estructuras glicano a un residuo mono GlcNAc para producir HA monoglucosilada (HA_{mg}). Por consiguiente, se generaron un total de cuatro glicoformas de HA: HA_{fg}: HA completamente glucosilada de células HEK293E humanas; HA_{ds}: HA desialilada de tratamiento de neuraminidasa (NA) de HA_{fg}; HA_{hm}: HA tipo alta manosa de células HEK293S humanas deficientes en N-acetilglucosaminil transferasa I (GnTI⁻), y HA_{mg}: HA con un residuo mono N-acetil glucosamina en sus sitios de glucosilación de tratamiento de Endoglucosidasa H (Endo H) de HA_{hm} (Fig.1A y Fig. 6). Las estructuras

glicano se verifican por análisis espectral de masas (Figs. 7, 8, 9). El dicroísmo circular de las variantes confirmó que sus estructuras secundarias son similares (Fig. 1C). A continuación se estudió el efecto único de los N-glicanos sobre HA de diferentes glicoformas, asumiendo que las estructuras 3D proteínicas de estas muestras son similar y no causan sesgos en el análisis (Fig 1B). Se anota que un intento por expresar HA funcional en *Escherichia coli* falló debido a la falta de glucosilación.

[0096] Más aún, análisis de espectrometría de masas confirmaron que (a) HA_{fg} contiene predominantemente los N-glicanos tipo complejo (Fig. 7A); (b) los ácidos siálicos se han eliminado de los N-glicanos tipo complejo en HA_{ds} (Fig. 7B); (c) HA_{hm} contiene predominantemente los N-glicanos tipo alta manosa (Fig. 7C); y (d) HA_{mg} mostró únicamente una N-acetilglucosamina (GlcNAc) en HA (Fig. 1 y Fig 8).

Identificación del microarreglo de glicanos de variantes glucosiladas de HA

[0097] Se examinó la identificación del microarreglo de glicanos de variantes glucosiladas de HA, HA_{fg}, HA_{ds}, HA_{hm}, y HA_{mg} utilizando el método sándwich tradicional. El arreglo de glicanos de ácido siálico sintético se componía de 17 de los sialósidos α 2,3 (glicanos 1-17) y 7 de los sialósidos α 2,6 (glicanos 21-27), diseñados para explorar la especificidad glicano de virus de la gripe (véase Fig. 4). Se prepararon los sialósidos sintéticos con un conector de cinco carbonos terminados con amina y se adhirieron covalentemente en placas de vidrio recubiertas con NHS formando un enlace amida bajo condiciones acuosas a temperatura ambiente. El procedimiento de impresión se basó en la tecnología de impresión robótica de microarreglo estándar, como se informó previamente (Blixt O, et al. (2004) Proc Natl Acad Sci USA 101:17033-17038; Wang CC, et al. (2008) Proc Natl Acad Sci USA 105:11661-11666). Variantes de HA se aplicaron a las placas de ácido siálico y luego se hibridaron con anticuerpo primario, seguido por la detección con un anticuerpo secundario

conjugado a Cy3. Este análisis indicó que la secuencia de consenso HA H5N1 se une específicamente a los sialósidos $\alpha 2,3$ pero no a los sialósidos $\alpha 2,6$ (Fig. 2A), de acuerdo con estudios previos (Chandrasekaran A, et al. (2008) Nat Biotechnol 26:107-113; Stevens J, et al. (2008) J Mol Biol 381:1382-1394). Sorpresivamente, la fuerza de unión con los sialósidos $\alpha 2,3$ creció sucesivamente con más intensidad desde HA_{fg}, HA_{ds}, y HA_{hm}, a HA_{mg} (Fig. 2A) por unión cualitativa mediante intensidad de fluorescencia relativa.

[0098] Las HAs se contactaron con un arreglo de glicanos sintéticos que contenía 17 sialósidos $\alpha 2-3$ (glicanos 1-17) y 7 sialósidos $\alpha 2-6$ (glicanos 21-27) diseñados para el virus de la gripe (Fig. 4), y luego las proteínas HA se hibridaron con anticuerpo primario no etiquetado, seguido por detección mediante anticuerpo secundario marcado con Cy3. El análisis indicó que la hemaglutinina H5N1 de la gripe de la secuencia de consenso puede unirse específicamente a los sialósidos $\alpha 2-3$ pero no a los sialósidos $\alpha 2-6$ (Fig 2A). Sorpresivamente, la unión con los sialósidos $\alpha 2-3$ fue sucesivamente más fuerte desde HA_{fg}, HA_{ds}, HA_{hm}, a HA_{mg} (Fig 2A) en la comparación de intensidad de la identificación del arreglo de glicanos.

Microarreglo cuantitativo de glicanos

[0099] La identificación del arreglo de glicanos se ha limitado a las naturalezas cuantitativas en la investigación de episodios de unión, porque ésta sólo proporciona la intensidad de fluorescencia relativa, y los usuarios no pueden diferenciar la afinidad de unión a receptores de los experimentos separados. Con el fin de determinar precisamente los episodios de unión, esta plataforma de microarreglo se amplió para determinar cuantitativamente las constantes de disociación de las interacciones HA-glicanos.

[0100] Se diseñó un arreglo cuantitativo para determinar las constantes de

disociación en la superficie (Liang PH, et al. (2007) J Am Chem Soc 129:11177-11184). Para evitar el sesgo por la superposición de anticuerpos, HA se etiquetó directamente con la tinte fluorescente Cy3 (Srinivasan A, et al. (2008) Proc Natl Acad Sci USA 105:2800-2805). Se realizaron análisis de unión directa por dilución consecutiva de HAs etiquetadas con Cy3 para establecer las intensidades de unión relativas. Las constantes de disociación en la superficie se determinaron graficando las concentraciones de HA contra la intensidad de fluorescencia para cada uno de los 24 sialósidos impresos en el porta-objetos (*glass slide*). Los valores de la constante de disociación $K_{D,surf}$ se calcularon basándose en las isothermas de Langmuir (véase Fig. 2B). La unión HA-sialósido monovalente es débil, exhibiendo constantes de disociación en rango milimolar ($K_D = 2.5 \times 10^{-3}$ M) (Sauter NK, et al. (1989) Biochemistry 28:8388-8396); no obstante, HA se encuentra implicada en interacciones multivalentes con sialósidos en la superficie de la célula anfitriona, lo cual puede verse en la identificación de arreglo cuantitativo (Tabla 2). Los valores $K_{D,surf}$ disminuyeron global y sustancialmente a medida que decreció la longitud de los N-glicanos en HAs (Fig 2B).

[0101] Todas las glicoformas HA mostraron una fuerte unión a los glicanos de receptor con un grupo sulfato en la posición 6 del tercer residuo GlcNAc del extremo no reductor (glicanos 4 y 7). Este grupo sulfato es importante para la unión a HA H5 (Chandrasekaran A, et al. (2008) Nat Biotechnol 26:107-113; Stevens J, et al. (2008) J Mol Biol 381:1382-1394). Adicionalmente, se observó que el glicano 4 es el mejor ligando para HA_{fg} , mientras que los 13-15 son mejores ligandos que el glicano 6 para HA_{mg} , indicando una posible interacción multivalente dentro del sitio de unión a ligando, o la exposición de más dominios de unión a receptor a sialósidos biantenarios más grandes (glicanos 13 y 14). Curiosamente, la unión de HA se aumenta sustancialmente a medida que sus estructuras N-glicano se hacen menos complejas (Fig. 2B). Sin embargo, aunque los valores $K_{D,surf}$ para HA_{mg} muestran una unión más fuerte y similar a unos pocos glicanos

SA, las demás variantes de HA exhiben una unión más débil y más específica a ligandos glicano (Figs. 2B y 10). Por consiguiente, la especificidad de unión y la afinidad de unión pueden tener una relación inversa, que se modula por la estructura glicano. Esta modulación puede tener una significación biológica importante, porque los carbohidratos en HA pueden afinar su reconocimiento de receptores de glicano en las células epiteliales del pulmón.

Contribución de la energía de unión de sialósidos de receptor

[0102] Pueden aplicarse parámetros cinéticos a parámetros termodinámicos para ilustrar los episodios de interacción en detalles moleculares. La constante de disociación ($K_{D,surf}$) de interacciones HA-glicano puede utilizarse para calcular la variación de energía libre de Gibbs de la unión (ΔG_{multi}). Los valores para ΔG_{multi} representan una medición cuantitativa de estabilizar energía de interacciones HA-glicano. Una disminución sucesiva en ΔG_{multi} se correlacionó con la caída sistemática en complejidad/truncamiento de las estructuras N-glicano en HA (Tabla 2).

Tabla 2. Constantes de disociación ($K_{D,surf}$) y variaciones de energía libre (ΔG) de variantes glucosiladas de HA cuando se unen a los sialósidos $\alpha 2,3$ 1-15

Sialósidos	K _{D,surf} , $\mu\text{M} \pm \text{SD}$				ANOVA P*	ΔG , kcal/mol $\pm \text{SD}$			
	HA _{tg}	HA _{tg}	HA _{tg}	HA _{tg}		HA _{tg}	HA _{tg}	HA _{tg}	HA _{tg}
1	6.99 $\pm$ 0.41	2.86 $\pm$ 0.93	2.09 $\pm$ 0.59	0.27 $\pm$ 0.16	<0.0001	-7.03 $\pm$ 0.03	-7.58 $\pm$ 0.19	-7.76 $\pm$ 0.17	-8.80 $\pm$ 0.15
2	3.72 $\pm$ 1.01	2.47 $\pm$ 0.21	1.75 $\pm$ 0.32	0.20 $\pm$ 0.07	0.0002	-7.41 $\pm$ 0.16	-7.66 $\pm$ 0.06	-7.86 $\pm$ 0.11	-9.03 $\pm$ 0.07
3	4.55 $\pm$ 1.85	2.34 $\pm$ 0.27	0.92 $\pm$ 0.16	0.26 $\pm$ 0.06	0.0002	-7.31 $\pm$ 0.25	-7.68 $\pm$ 0.07	-8.24 $\pm$ 0.10	-8.90 $\pm$ 0.01
4	0.27 $\pm$ 0.01	0.27 $\pm$ 0.05	0.33 $\pm$ 0.09	0.13 $\pm$ 0.06	0.0048	-8.96 $\pm$ 0.03	-8.95 $\pm$ 0.10	-8.84 $\pm$ 0.16	-9.45 $\pm$ 0.27
5	ND	5.20 $\pm$ 1.01	9.40 $\pm$ 3.20	0.54 $\pm$ 0.15	ND	ND	-7.21 $\pm$ 0.11	-6.88 $\pm$ 0.21	-8.49 $\pm$ 0.13
6	20.03 $\pm$ 4.24	9.22 $\pm$ 2.05	2.71 $\pm$ 0.53	0.80 $\pm$ 0.05	<0.0001	-6.41 $\pm$ 0.13	-6.87 $\pm$ 0.13	-7.65 $\pm$ 0.06	-8.32 $\pm$ 0.05
7	0.57 $\pm$ 0.10	0.77 $\pm$ 0.08	0.61 $\pm$ 0.02	0.32 $\pm$ 0.10	0.0010	-8.46 $\pm$ 0.06	-8.36 $\pm$ 0.04	-8.47 $\pm$ 0.02	-8.78 $\pm$ 0.14
8	2.49 $\pm$ 0.58	2.48 $\pm$ 0.41	1.69 $\pm$ 0.53	0.36 $\pm$ 0.13	0.0008	-7.65 $\pm$ 0.14	-7.65 $\pm$ 0.10	-7.89 $\pm$ 0.21	-8.82 $\pm$ 0.30
9	ND	15.34 $\pm$ 5.06	4.40 $\pm$ 0.56	0.86 $\pm$ 0.34	ND	ND	-6.58 $\pm$ 0.20	-7.31 $\pm$ 0.08	-8.18 $\pm$ 0.16
10	7.64 $\pm$ 2.3	3.61 $\pm$	1.22 $\pm$	0.29 $\pm$	0.0003	-6.99 $\pm$	-7.43 $\pm$	-8.09 $\pm$	-8.77 $\pm$
		0.61	0.52	0.14		0.18	0.10	0.24	0.03
11	6.02 $\pm$ 1.04	2.32 $\pm$ 0.14	1.11 $\pm$ 0.51	0.33 $\pm$ 0.08	<0.0001	-7.12 $\pm$ 0.10	-7.68 $\pm$ 0.04	-8.15 $\pm$ 0.25	-8.91 $\pm$ 0.18
12	40.23 $\pm$ 9.77	ND	2.45 $\pm$ 0.52	1.41 $\pm$ 0.92	ND	-6.00 $\pm$ 0.15	ND	-7.66 $\pm$ 0.12	-7.85 $\pm$ 0.25
13	3.38 $\pm$ 1.06	1.37 $\pm$ 0.30	0.31 $\pm$ 0.06	0.07 $\pm$ 0.01	0.0008	-7.47 $\pm$ 0.19	-8.05 $\pm$ 0.13	-8.88 $\pm$ 0.13	-9.77 $\pm$ 0.09
14	2.72 $\pm$ 0.41	0.97 $\pm$ 0.41	0.42 $\pm$ 0.03	0.09 $\pm$ 0.01	<0.0001	-7.59 $\pm$ 0.09	-8.27 $\pm$ 0.28	-8.69 $\pm$ 0.04	-9.60 $\pm$ 0.01
15	2.37 $\pm$ 0.19	1.32 $\pm$ 0.16	0.89 $\pm$ 0.35	0.09 $\pm$ 0.01	0.0002	-7.67 $\pm$ 0.05	-8.02 $\pm$ 0.07	-8.29 $\pm$ 0.27	-9.62 $\pm$ 0.08

[0103] Tabla 2 muestra parámetros termodinámicos de HA con diferentes glucosilaciones en respuesta a los sialósidos $\alpha 2,3$ 1-15. Se muestran las variaciones de energía libre (ΔG) y $K_{D,surf}$ de interacciones HA-glicano en respuesta a los sialósidos $\alpha 2,3$ 1-15. Los valores ΔG pueden derivarse de los valores $K_{D,surf}$ utilizando la ecuación $\Delta G_{multi} = -RT \ln(K_{D,surf}^{-1})$. Los valores de ΔG se calcularon de acuerdo con los valores $K_{D,surf}$ para obtener variaciones de energía libre en la unión HA-glicano. $\Delta G(HA_{fg})$ de los glicanos 5 y 9 no está determinada. ND indica no determinado. (*Del conjunto de 15 sialósidos de unión a HA identificados, diferencias estadísticamente significativas de valores $K_{D,surf}$ entre cuatro glicoformas de HA se muestran utilizando una ANOVA de una sola vía ($P < 0.05$ se considera significativo)).

[0104] Las diferencias en variación de energía libre ($\Delta\Delta G$) entre variantes HA son causadas por estructuras glicano únicas (Figura 10), y la diferencia máxima está entre HA_{fg} y HA_{mg} ($\Delta\Delta G HA_{fg} \rightarrow HA_{mg}$; véase Figura 10), lo cual es consistente con la diferencia máxima en energía de unión resultante de recortar la mayor cantidad del N-glicano a mono GlcNAc. Se anota que los valores de $\Delta\Delta G$ son similares, excepto para los glicanos 4 y 7 (Figura 10), indicando que los glicanos en HA no afectan significativamente la afinidad de unión con el trisacárido $\alpha 2,3$ sulfatado (Chandrasekaran A, et al. (2008) Nat Biotechnol 26:107-113).

Unión HA-receptor

[0105] Los detalles moleculares de la unión HA-receptor (es decir, la contribución de cada componente estructural que comprende un receptor glicano) pueden abordarse comparando las diferencias en variación de energía libre (valores $\Delta\Delta G$) entre diferentes sialósidos de receptor (Figs. 4 y 11). Examinar detenidamente la contribución de energía de los sialósidos de receptor, responsables de la unión a HA, revela puntos claves de especificidad que se utilizan para diseñar nuevos inhibidores de HA.

Sialósidos $\alpha 2,3$ conectados a residuos de galactosa con conexiones $\beta 1,4$ (Gal $\beta 1-4$) poseen una mejor afinidad de unión que aquellos con conexiones Gal $\beta 1-3$ (Stevens J, et al. (2008) J Mol Biol 381:1382-1394). Esto se refleja en la comparación de la cadena principal disacárido Neu5Ac- $\alpha 2,3$ -galactosa (Neu5Ac $\alpha 2,3$ Gal) (Fig. 4A, glicano 1, casilla roja resaltada), en donde los trisacáridos 3 y 6 difieren únicamente en la conexión entre Gal y GlcNAc. Aquí, la $\Delta\Delta G(1 \rightarrow 3)$ para todas las variantes HA es negativa (estabilizando la interacción HA-receptor), mientras que la $\Delta\Delta G(1 \rightarrow 6)$ para todas las variantes HA es positiva (desestabilizando la interacción HA-receptor; Figs. 4A y 11). Esta observación indica que Neu5Ac- $\alpha 2,3$ Gal $\beta 1-4$ Glc/GlcNAc es el componente glicano central que interactúa con la bolsa de unión a HA. Más aún, el valor de $\Delta\Delta G(1 \rightarrow 9)$ para todas las variantes HA es positivo, indicando una perturbación negativa causada por la manosa $\beta 6$ -enlazada en la tercera posición (Figs. 4A y 11). Por consiguiente, la energía de unión se afecta por residuos azúcar internos y sus patrones de conexión al ligando disacárido Neu5Ac- $\alpha 2,3$ Gal distal (Fig. 4A). Este análisis muestra que un residuo GlcNAc en la tercera posición se favorece para todas las variantes HA. No obstante, comparando los valores $\Delta\Delta G$ para los glicanos 13 y 14 (Figs. 4E y 11) con el glicano 6, son evidentes interacciones multivalentes en el sitio de unión con el sialósido biantenarico, y para HA_{mg}, esta avidéz intramolecular es más significativa para impulsar la unión que el efecto estructural ejercido por el tercer azúcar.

[0106] A continuación, se compararon los glicanos 10, 11, 12, y 15 de receptor. Éstos tienen la misma estructura central básica (trisacárido glicano 8) pero difieren por alargamiento (glicanos 11 y 12) o adición de un ácido $\alpha 2,6$ siálico en la tercera posición (glicano 15; Fig. 4B). Es interesante que el sialósido con el ácido $\alpha 2,6$ siálico ramificado aumentó en gran medida la avidéz de HA, mientras que el sialósido $\alpha 2,3$ más largo, que se extiende del glicano 8, resultó en una unión más débil por HAs ($\Delta\Delta G(8 \rightarrow 15) > \Delta\Delta G(8 \rightarrow 11) \sim \Delta\Delta G(8 \rightarrow 10) > \Delta\Delta G(8 \rightarrow 12)$; Fig. 4B y 11).

[0107] Los glicanos 3-5 y 6-7 comparten la misma cadena principal trisacárido pero difieren por la adición de un grupo sulfato (glicano 4) o residuo fucosa (glicano 5) en la tercera GlcNAc del extremo no reductor. El grupo sulfato puede estabilizar la interacción glicano HA-receptor hasta 2.044 kcal/mol ($\Delta\Delta G$ (6 $\rightarrow$ 7)), la máxima brecha de energía entre dos sialósidos de receptor. Entre todas las variantes HA, la variante completamente glucosilada mostró las diferencias más significativas en variaciones de energía libre, con valores de $\Delta\Delta G$ (3 $\rightarrow$ 4) HA_{fg} ($\square$ 1.653 kcal/mol) y $\Delta\Delta G$ (6 $\rightarrow$ 7) HA_{fg} ($\square$ 2.044 kcal/mol), y el tamaño de la ganancia de energía libre disminuyó a medida que la estructura glicano se simplificó aún más; es decir, HA_{fg} > HA_{ds} > HA_{hm} > HA_{mg}. Por consiguiente, los glicanos sulfatados mejoran dramáticamente la unión a HA, y la HA completamente glucosilada maximiza este efecto (Figs. 4C y D), el cual es importante para la patogénesis H5N1. Por otro lado, los análogos de receptor fucosilados desestabilizan en gran medida la unión a HA, mostrando todas las variantes HA glucosiladas una $\Delta\Delta G$ (3 $\rightarrow$ 5) positiva (Fig. 4C). Estas grandes diferencias en $\Delta\Delta G$ (3 $\rightarrow$ 4) y $\Delta\Delta G$ (3 $\rightarrow$ 5) se causan probablemente por una importante interacción de unión en la bolsa de unión a receptor, que el grupo sulfato maximiza y la fucosa bloquea estéricamente. No es probable que la débil unión de HA_{fg} se deba a la competición de sus sialiloglicanos, porque la eliminación de ácido siálico tiene un efecto pequeño sobre la unión, y HA_{fg} exhibe todavía una fuerte afinidad para ciertos sialiloglicanos específicos.

Diseño de vacuna utilizando HA monoglucosilada

[0108] La hemaglutinina monoglucosilada HA_{mg} muestra una estructura secundaria similar y una mejor afinidad de unión a receptores del anfitrión, comparada con su contraparte completamente glucosilada. Estudios recientes indicaron asimismo que un residuo mono GlcNAc a Asn es el componente mínimo del N-glicano requerido para el plegamiento y

estabilización de la glucoproteína (Hanson SR, et al. (2009) Proc Natl Acad Sci USA 106:3131-3136). Como las proteínas son inmunógenos superiores a los glicanos, se examinó la HA monoglucosilada como una vacuna proteínica contra virus de la gripe. Antisueros de inmunizaciones HA_{fg} y HA_{mg} se compararon con respecto a su capacidad de unir HAs nativas y neutralizar virus H5 (Fig. 5). Por supuesto, en contraste con HA_{fg}, el antisuero de HA_{mg} mostró una neutralización más fuerte del virus. El antisuero de HA_{mg} se une también a H1 (Nueva Caledonia/1999) además de los subtipos H5 Vietnam/1194, H5 (Anhui), y H5 (ID5/2005) (Fig. 5D). En particular, la vacuna HA_{mg} fue mucho más protectora que la vacuna HA_{fg} en el estudio de exposición (Fig. 5C).

[0109] Las secuencias de aminoácidos de H1, H3, y H5 aisladas de humanos se compararon (Fig. 3). Cuando se compara H1 vs. H3 y H3 vs. H5, se observan diferencias en las secuencias totales de aminoácidos, así como aquellas próximas a los sitios de N-glucosilación. H1 y H5 muestran similitudes más altas de secuencias generales de aminoácidos, y las secuencias próximas a los sitios de N-glucosilación son más conservadas. Cepas H1 (A/Brisbane/59/2007) estacional y (A/California/07/2009) pandémica muestran alrededor de 79% de identidad de secuencia. La identidad de secuencia general fue de alrededor de 63% entre H1 y H5, y alrededor de 40% entre H3 y H5, y H1 y H3. Adicionalmente, los sitios de N-glucosilación (mostrados en las casillas rojas Fig. 3) y las secuencias peptídicas subyacentes son más conservadas entre H1 y H5 que entre H1/H3 y H5.

[0110] La presente invención muestra que la simplificación sistemática de N-glicanos en HA resulta en un aumento sucesivo en la unión a sialósidos $\alpha 2,3$ pero no a los sialósidos $\alpha 2,6$. Los inventores, por primera vez, muestran el efecto de glicanos interiores y exteriores de HA sobre la unión a receptor y para examinar cuantitativamente la afinidad de unión y las contribuciones energéticas de las interacciones HA-receptor.

[0111] La glucosilación de HA afecta la función de la HA de la gripe (Wagner R, et al. (2002) J Gen Virol 83:601-609). Curiosamente, como el nivel de glucosilación sobre H3N2 de la gripe ha aumentado desde 1968, la morbilidad, mortalidad, y los títulos pulmonares víricos han disminuido (Vigerust DJ, et al. (2007) J Virol 81:8593-8600).

[0112] Sin entrar en limitaciones teóricas, el descubrimiento de que HA con una mono GlcNAc adherida a los sitios de glucosilación muestra una especificidad relajada, pero una afinidad mejorada a los sialósidos $\alpha 2,3$, sugiere que los N-glicanos en HA pueden ocasionar impedimento estérico cerca del dominio de unión HA-receptor. La elevada especificidad para sialósidos de receptor puede impedir que el virus se una a algunos otros glicanos específicos en la superficie de las células epiteliales pulmonares humanas. Por otro lado, HA con glicanos trucados puede reconocer sialósidos de receptor $\alpha 2,3$ con una afinidad de unión más elevada y menor especificidad, sugiriendo que reducir la longitud de glicanos en HA puede aumentar el riesgo de infección de la gripe aviar. Sin embargo, no es claro cómo los cambios de interacción HA-receptor mediante glucosilación afectan la infectividad del virus y la actividad NA en el ciclo de vida vírica.

[0113] HA con una mono GlcNAc es un candidato prometedor para una vacuna de la gripe porque tal constructo conserva la estructura intacta de HA y puede prepararse fácilmente (v.g., mediante levadura). Puede exponer asimismo epítomos conservados, ocultos por glicanos grandes, para provocar una respuesta inmunitaria que reconoce variantes de HA en un título más elevado. Esta estrategia abre una nueva dirección para el diseño de vacunas y, junto con otras estrategias de vacunas diferentes (Hoffmann E, et al. (2005) Proc Natl Acad Sci USA 102:12915-12920; Huleatt JW, et al. (2008) Vacuna 26:201-214; Scanlan CN, et al. (2007) J Mol Biol 372:16-22; Yang ZY, et al. (2007) Science 317:825-828) y recientes

descubrimientos de anticuerpos neutralizantes de HA (Ekiert DC, et al. (2009) Science 324:246-251; Kashyap AK, et al. (2008) Proc Natl Acad Sci USA 105:5986-5991; Scheid JF, et al. (2009) Nature 458:636-640; Stevens J, et al. (2006) Science 312:404-410; Sui JH, et al. (2009) Nat Struct Mol Biol 16:265-273), deben facilitar el desarrollo de vacunas contra virus tales como el de la gripe, el virus de la hepatitis C, y el VIH.

[0114] Por consiguiente, se examinó si HA con una mono GlcNAc puede ser un candidato prometedor para una vacuna de la gripe. Debido a las ventajas de su fuerte unión con los sialósidos $\alpha 2,3$, HA con una mono GlcNAc puede provocar una respuesta inmunitaria que reconozca la región próxima al dominio de unión a receptor (RBD – *receptor binding domain*) con títulos más elevados, indicando que la adición de oligosacáridos puede ser un medio efectivo de evasión inmunitaria mediante la modificación o enmascaramiento de epítomos antigénicos en el virus. Por lo tanto, la estrategia de eliminación de la mayoría de los glicanos, pero conservando por lo menos una mono GluNAc, abre una nueva dirección para el diseño futuro de vacunas, y este concepto ofrece una visión muy reveladora del diseño de otras vacunas anti-víricas tales como VHC, VHB, y VIH. Otras iteraciones tienen dos, tres, o más glicanos restantes de la cadena de glicanos original.

Glucoproteínas de superficie celular parcialmente glucosiladas como vacunas

[0115] Las glucoproteínas de superficie celular de virus constituyen dianas excelentes para el desarrollo de vacunas. No obstante, tales proteínas de superficie son a menudo altamente glucosiladas por el anfitrión para proteger el virus del sistema inmunitario del anfitrión. Adicionalmente, las secuencias proteínicas víricas alrededor de los sitios de glucosilación están a menudo altamente conservadas y, por consiguiente, son un excelente antígeno para el diseño de vacunas; no obstante, estas regiones altamente

conservadas no se encuentran fácilmente disponibles al sistema inmunitario del anfitrión por lo menos en parte, debido a la cantidad de glucosilación que cubre o bloquea esas regiones. Por ejemplo, una razón del éxito limitado en la preparación de vacunas contra el VIH intacto es porque gp120 de superficie vírica es altamente glucosilada.

[0116] La nueva vacuna es más inmunogénica y se espera que el anticuerpo inducido tenga una mejor actividad de neutralización contra la glucoproteína intacta, que se elabora por el virus y el anfitrión. El anticuerpo es capaz de atacar la(s) región (regiones) menos glucosilada(s) o no glucosilada(s), la cual (las cuales) tiene(n) más probabilidad de mutar y la región glucosilada que es altamente conservada, tiene menos probabilidad de mutar y/o es menos sensible a la mutación. Un anticuerpo generado en esa forma interactuará fuertemente con la parte de la proteína diana, ya que tal anticuerpo tiene una afinidad más alta para proteína que para carbohidrato y, por consiguiente, termodinámicamente alejará la cadena glicano para unir las regiones altamente conservadas alrededor de los sitios de glucosilación.

[0117] En las glucoproteínas O- y N-enlazadas, el primer azúcar (N-acetilglucosamina para N-glucoproteínas y N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina para O-glucoproteínas) es esencial para preservar la estructura terciaria de la glucoproteína, mientras que el resto de los azúcares no son importantes. El tratamiento de N-glucoproteínas con la endoglucosidasa (endoH) eliminará la cadena de azúcar y mantendrá la N-acetilglucosamina adherida a la proteína. Pueden usarse igualmente manosidasas para escindir N-glucoproteínas a di- o triglicanos, los cuales se contemplan expresamente en esta especificación como posibles vacunas, debido a la capacidad del sistema inmunitario de acceder a los sitios de glucosilación conservados en las proteínas, incluso con proteínas di-, tri-, y más desglucosiladas. Otras glucosidasas están también disponibles para eliminar la cadena de azúcar de O-glucoproteínas y mantener el primer

azúcar adherido a la proteína.

[0118] Cuando una hemaglutinina (HA) completamente glucosilada de gripe aviar (H5) expresada en células humanas se trata con endoH para reducir la glucosilación a un estado monoglucosilado y se utiliza en la inmunización de conejos, el antisuero generado tiene un mayor título que el antisuero generado de la hemaglutinina completamente glucosilada. (Figs. 13A-13B). Es también capaz de neutralizar la hemaglutinina de otras cepas de gripe aviar y la hemaglutinina H1 de la gripe humana, mientras que el antisuero de la HA completamente glucosilada no puede neutralizar H1 y es más específica para la cepa de la gripe aviar.

[0119] La similitud del patrón de glucosilación y estructura proteínica entre H1 y H5 ofrece una posible razón de por qué el antisuero de H5 monoglucosilada reacciona cruzadamente con H1. Los datos se obtuvieron utilizando antisueros de conejo. (Fig. 13). Como se muestra en Figs. 12-14, la hemaglutinina de H3 no tiene el mismo grado de homología que HA H5 tiene con HA H1. Por consiguiente, los antisueros generados de H1 y H5 no neutralizan H3. No obstante, puesto que H3 comparte otra homología en las regiones conservadas con H1 y H5, el antisuero generado de hemaglutinina H3 desglucosilada neutraliza la hemaglutinina H1 y la hemaglutinina H5 además de la hemaglutinina H3.

[0120] Para preparar hemaglutinina monoglucosilada, no es necesario elaborar la glucoproteína de cultivo de células humanas ya que la glucoproteína con los primeros tres azúcares (Manosa—N-acetilglucosamina—N-acetilglucosamina) o únicamente el monosacárido (N-acetilglucosamina) adherido a la proteína (es decir, N-acetilglucosamina—proteína) está altamente conservada en eucariotas. Por lo tanto, se puede fabricar la glucoproteína en levadura, baculovirus, u otros anfitriones eucariotas y tratar la mezcla de glucoproteína con la glucosidasa apropiada, tal como endoH o manosidasa para glucoproteínas N-enlazadas,

para preparar la proteína monoglucosilada homogénea para uso como vacuna.

[0121] Sin entrar en limitaciones teóricas, se postula que el glicano N-enlazado es mucho más largo que el glicano O-enlazado y que es el glicano N-enlazado el que necesita recortarse para eliminar el resto de las cadenas de azúcar. En consecuencia, el glicano O-enlazado no causará un problema, incluso si está intacto.

[0122] Una glucoproteína nativa que se expone al sistema inmunitario tiene una glucoproteína ramificada N-enlazada. Debido a la glucosilación, la región altamente conservada es inaccesible al sistema inmunitario. En consecuencia, el sistema inmunitario puede reconocer únicamente regiones altamente variables, haciendo así al sujeto susceptible a múltiples infecciones víricas, a medida que las regiones variables mutan. Si el sistema inmunitario es capaz de acceder a las regiones altamente conservadas, entonces los anticuerpos dirigidos contra estas secuencias, que no varían con el tiempo, ofrecen una ruta hacia la inoculación contra virus que, o bien tienen regiones variables que mutan y, por consiguiente, hacen inefectivos los anticuerpos existentes contra las glucoproteínas, o bien están tan densamente glucosilados como para ser sustancialmente inaccesibles al variable al sistema inmunitario.

[0123] En consecuencia, para hacer la proteína accesible al sistema inmunitario mediante una vacuna, se elimina la glucosilación, exponiendo así la proteína vírica nativa al sistema inmunitario. Es importante destacar que se ha demostrado que la completa eliminación de los azúcares de la proteína hace que la proteína se desnaturalice; en muchas glucoproteínas víricas, la glucosilación es un componente clave para la estructura terciaria de la glucoproteína.

[0124] Los azúcares se eliminan exponiendo las proteínas glucosiladas

nativas, aisladas, a una N-glucosidasa, por ejemplo endoH o manosidasa, las cuales escindirán todos menos los primeros uno, dos, o tres azúcares de la glucoproteína, sin hacer que la proteína pierda su estructura terciaria. Las proteínas desglucosiladas se formulan entonces con un portador farmacéutico apropiado como una vacuna y se administran a un sujeto. Puesto que las regiones de glucosilación altamente conservadas están ahora desglucosilados y, en consecuencia, expuestas al sistema inmunitario, se generan anticuerpos contra las regiones altamente conservadas.

[0125] Cuando los sujetos inmunizados se infectan con el virus, y las glucoproteínas víricas se exponen al sistema inmunitario, los anticuerpos que se dirigen a las regiones altamente conservadas de la proteína están presentes en el sistema del sujeto. Por lo tanto, la mutación en regiones variables se vuelve irrelevante porque hay aún anticuerpos dirigidos a las regiones conservadas no mutantes de la glucoproteína.

[0126] Más aún, la glucosilación no impide la unión de los anticuerpos a las regiones altamente conservadas porque los anticuerpos se inclinan termodinámicamente a unirse a la proteína y "sacan" a los azúcares del camino para la unión de los anticuerpos a las regiones altamente conservadas. Hay que destacar, en las proteínas víricas tales como gp120 del VIH, que esta estrategia facilita un método y una composición para inoculación donde el sistema inmunitario, de lo contrario, no produciría un título de anticuerpos lo suficientemente grande para combatir efectivamente la infección.

[0127] De acuerdo con implementaciones que incorporan estos principios, se contempla una vacuna que contiene por lo menos una hemaglutinina desglucosilada y un portador farmacéuticamente aceptable. La vacuna puede elaborarse utilizando cualquier sistema que exprese proteínas glucosiladas, tales como levadura y baculovirus. Una vez elaboradas las proteínas, éstas se aíslan empleando un método apropiado, tal como

electroforesis en gel, cromatografía, u otros métodos capaces de aislar proteínas.

[0128] El patrón de glucosilación en el sitio de glucosilación se conserva en casi todas las eucariotas (GlcNAc-GlcNAc-Man). Por lo tanto, no importa cuál sea el patrón de glucosilación corriente abajo, siempre y cuando permanezcan los primeros 1-3 azúcares (potencialmente más, dependiendo del organismo que se está inoculando y del organismo que produce la proteína). En consecuencia, para una vacuna humana, puede utilizarse levadura para producir la proteína usada en una vacunación humana, porque una vez se hayan escindido todos, menos los primeros azúcares del uno al tres, el patrón es idéntico a los primeros azúcares uno a tres en la versión humana de la glucoproteína. Por consiguiente, la presente divulgación provee una plataforma única para una producción de alto rendimiento de vacunas contra virus tales como el virus de la gripe, VIH, y flavivirus.

[0129] Para generar las vacunas, las proteínas glucosiladas se aíslan y luego se desglucosilan (parcialmente) usando una glucosidasa, u otra enzima o método que selectivamente digiera los carbohidratos que forman la glucosilación. Sin embargo, no importa qué método se use para escindir las cadenas de azúcar, no tiene que afectar la estructura terciaria de la proteína subyacente.

[0130] Las glucoproteínas parcialmente glucosiladas, o sus fragmentos, pueden prepararse también sintéticamente. Existen dos estrategias para la síntesis de glicopéptidos. (i) método paso a paso: glucosilaminoácidos se utilizan como elemento estructural para síntesis de fase sólida. La ventaja de esta metodología es el "amplio uso" para la preparación de varios glicopéptidos. Este método permite la preparación de glicopéptidos que tienen algunas fracciones oligosacárido, (ii) método convergente: una fracción oligosacárido y una fracción péptido se preparan separadamente, luego se acoplan una con otra. Comúnmente, este enfoque se emplea para la

preparación de N-glicopéptidos. Esta estrategia requiere un grupo protector especial ortogonal de cadena lateral para el "punto de glucosilación" en la fracción péptido.

[0131] En una incorporación, N-acetilglucosamina (GlcNAc) adherida al residuo asparagina del péptido puede sintetizarse usando un método tioéster para construir el segmento polipéptido (Merrifield RB. J. Am. Chem. Soc. 85:2149 (1983)) y un método de anhídrido mixto dimetilfosfinotioico (Mpt-MA) para la incorporación de la fracción glicopéptido (Guo, ZW, et al. (1997) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 36, 1464-1466).

Vacunas de la gripe de reacción cruzada, generadas de proteínas HA monoglucosiladas

(A) Vacunación con proteína HA monoglucosilada H1 (Brisbane) estacional.

[0132] Se utilizó un análisis de inhibición de la hemaglutinación para detectar si antiseros de la vacuna H1 (Brisbane) pueden inhibir la capacidad del virus NIBRG-121 (cepa de la vacuna A/H1N1) 2009 pandémica) de aglutinar glóbulos rojos. Como se muestra en Figura 15A, antiseros de vacunación con HA mono-glucosilada (HA_{mg}) de H1 (Brisbane) demostraron una mejor aptitud de inhibir la capacidad del virus NIBRG-121 (H1N1/2009) de aglutinar glóbulos rojos que la HA completamente glucosilada (HA_{fg}) y HA no glucosilada HA (HA_{ug}).

[0133] Se utilizó un análisis de microneutralización para detectar si antiseros de la vacunación H1 (Brisbane) pueden neutralizar la capacidad del virus NIBRG-121 (cepa de la vacuna A(H1N1) pandémica 2009) de infectar células MDCK. Como se muestra en Figura 15B, HA mono-glucosilada (HA_{mg}) de H1 (Brisbane) demostró una mejor aptitud de neutralizar la capacidad del virus NIBRG-121 (H1N1/2009) de infectar

células MDCK que la HA completamente glucosilada (HA_{fg}) y HA no glucosilada (HA_{ug}).

[0134] Se condujo un experimento de exposición a virus para demostrar que la vacunación con HA mono-glucosilada de H1 (Brisbane) puede proteger contra la exposición al virus NIBRG-121 (cepa de la vacuna A(H1N1) pandémica 2009). Como se muestra en Figura 15C, la HA mono-glucosilada (Brisbane) como vacuna protege ratones BALB/c de la exposición al virus NIBRG-121 (cepa de la vacuna A(H1N1) pandémica 2009). Por contraste, la HA completamente glucosilada, que está presente vacunas tradicionales contra la gripe, hechas de virus inactivados, no revela capacidad de protección cruzada contra la infección por el virus H1N1 (cepa de la vacuna A(H1N1) pandémica 2009).

[0135] Figs. 16A-16C muestra la inhibición de WSN (H1N1) 1933 por antisueros generados utilizando HA H1 (Brisbane) mono-glucosilada como antígeno. Fig. 16A muestra la inhibición de la capacidad del virus WSN (H1N1) 1933 de aglutinar glóbulos rojos. Fig. 16B muestra la inhibición de la capacidad del virus WSN (H1N1) 1933 de infectar células MDCK. Figura 16C muestra la protección de ratones BALB/c contra la infección por el virus de la gripe WSN (H1N1) 1933. Los antisueros utilizados fueron de ratones inmunizados con proteínas HA Brisbane ($5\mu g$) y el virus empleado para la prueba de provocación fue WSN (H1N1) 1933 ($100\times LD_{50}$).

[0136] Como se muestra en Figura 16A, antisueros de vacunación con HA mono-glucosilada (HA_{mg}) de H1 (Brisbane) demostraron una mejor aptitud de inhibir la capacidad del virus WSN (H1N1) 1933 de aglutinar glóbulos rojos que la HA completamente glucosilada (HA_{fg}) y HA no glucosilada (HA_{ug}). Como se muestra en Figura 16B, HA mono-glucosilada (HA_{mg}) de H1 (Brisbane) demostró una mejor aptitud de neutralizar la capacidad del virus WSN (H1N1) 1933 de infectar células MDCK que la HA

completamente glucosilada (HA_{fg}) y HA no glucosilada (HA_{ug}). Como se muestra en Figura 16C, la HA mono-glucosilada (Brisbane) como vacuna protege ratones BALB/c de la exposición al virus WSN (H1N1) 1933. Por contraste, la HA completamente glucosilada, que está presente en vacunas tradicionales contra la gripe hechas de virus inactivados, no revela capacidad protectora cruzada contra la infección por el virus WSN (H1N1) 1933.

[0137] Figs. 17A-17C muestra la inhibición de A/Puerto Rico/8/34 (H1N1): PR8 por antisueros generados utilizando HA H1 (Brisbane) mono-glucosilada como antígeno. Fig. 17A muestra la inhibición de la capacidad del virus PR8 de aglutinar glóbulos rojos. Fig. 17B muestra la inhibición de la capacidad del virus PR8 de infectar células MDCK. Figura 17C muestra la protección de ratones BALB/c contra la infección por el virus de la gripe PR8. Los antisueros empleados fueron de ratones inmunizados con proteínas HA Brisbane ($5\mu g$) y el virus utilizado para la exposición fue PR8 ($100 \times LD_{50}$).

[0138] Como se muestra en Figura 17A, antisueros de la vacunación con HA mono-glucosilada (HA_{mg}) de H1 (Brisbane) demostró una mejor aptitud de inhibir la capacidad del virus PR8 de aglutinar glóbulos rojos que la HA completamente glucosilada (HA_{fg}) y HA no glucosilada (HA_{ug}). Como se muestra en Figura 17B, HA mono-glucosilada (HA_{mg}) de H1 (Brisbane) demostró una mejor aptitud de neutralizar la capacidad del virus PR8 de infectar células MDCK que la HA completamente glucosilada (HA_{fg}) y HA no glucosilada (HA_{ug}). Como se muestra en Figura 17C, HA mono-glucosilada (Brisbane) como vacuna protege ratones BALB/c contra la exposición al virus PR8. Por contraste, HA completamente glucosilada, que está presente en vacunas tradicionales contra la gripe, hechas de virus inactivados, no revela capacidad protectora cruzada contra la infección por el virus PR8.

(B) Vacunación con una nueva proteína HA mono-glucosilada H1 (cepa de la vacuna A(H1N1) pandémica 2009).

[0139] La secuencia codificante HA H1 (cepa de la vacuna A(H1N1) pandémica 2009) de la gripe se aisló y modificó para expresión como se describe en el Ejemplo 1. Tabla 3 muestra la secuencia de la cepa H1/HA del-TM-FH6 de la vacuna A(H1N1) pandémica 2009 modificada, donde la secuencia peptídica señal está subrayada y en negrita, el sitio de escisión de trombina está en cursiva, la secuencia de trimerización foldon de fibrina del bacteriófago T4 y la His-tag están subrayadas, y la secuencia conectora está en negrita y subrayada.

Tabla 3. Secuencia de la hemaglutinina H1 de la gripe (cepa de la vacuna A(H1N1) pandémica 2009)

Secuencia de aminoácidos de la HA del-TM-FH6 de la cepa A(H1N1) pandémica 2009 de la gripe	
<u>MKAILVLLYTFATANADTLC</u> IGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLL	50
EDKHNGKLCKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETP	100
SSDNGTCYPGDFIDYEELREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVT	150
AACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNSYPKLSKSYINDKGKEVLVLWGIIHPS	200
TSADQQSLYQNADAYVFGSSRYSKKFKPEIAIRPKVRDQEGRMNYYWTL	250
VEPGDKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDCNTTCQTPK	300
GAINTSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNIPSIQSRGLFGAI	350
AGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVI	400
EKMNTQFTAVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENER	450
TLDYHDSNVKNLYEKVRSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGT	500
YDYPKYSEEAKLNREEIDGV <u>DIRSLVPRGSPGSGYIPEAPRDGQAYVRKD</u>	550
<u>GEWVLLSTFLGHHHHH</u>	
(SEQ ID NO: 6)	

Secuencia nucleotídica de la HA del-TM-FH6 de la cepa A(H1N1) pandémica 2009 de la gripe

```

1 ATGGCGCGCC GCTAGCATGA AGGCCATCCT GGTGTGCTG CTGTACACCT
51 TCGCTACCGC CAACGCCGAT ACCCTGTGCA TCGGCTACCA CGCCAACAAC
101 AGCACCGACA CCGTGGATAC CGTGCTGGAA AAGAACGTGA CCGTGACCCA
151 CAGCGTGAAC CTGCTGGAAG ATAAGCACAA CGGCAAGCTG TGCAAGCTGA
201 GAGGCGTGGC CCCTCTGCAC CTGGGCAAGT GCAATATCGC CGGCTGGATC
251 CTGGGCAACC CCGAGTGCGA GAGCCTGAGC ACCGCCAGCA GCTGGTCCTA
301 CATCGTGGAG ACACCCAGCA GCGACAATGG CACCTGTTAC CCCGGCGACT
351 TCATCGACTA CGAGGAACTG CGGGAGCAGC TGAGCAGCGT GTCCAGCTTC
401 GAGCGGTTCG AGATCTTCCC CAAGACCAGC TCTTGGCCCA ACCACGACAG
451 CAACAAGGGC GTGACCGCCG CCTGTCCTCA CGCTGGCGCC AAGAGCTTCT
501 ACAAGAACCT GATCTGGCTG GTCAAGAAGG GCAACAGCTA CCCCAAACTG
551 AGCAAGAGCT ACATCAACGA CAAGGGCAA GAAGTGCTGG TGCTGTGGGG
601 CATCCACCAC CCTAGCACCA GCGCCGACCA GCAGAGCCTG TACCAGAACG
651 CCGACGCCTA CGTGTTCTGT GGCAGCAGCC GGTACAGCAA GAAGTTCAAG
701 CCCGAGATCG CCATCAGACC CAAAGTGCGG GACCAAGAGG GCCGGATGAA
751 CTACTACTGG ACCCTGGTGG AGCCCGGCGA CAAGATCACC TTCGAGGCCA
801 CCGGCAATCT GGTCGTGCCC AGATACGCCT TCGCCATGGA AAGAAACGCC
851 GGCAGCGGCA TCATCATCAG CGACACCCCC GTGCACGACT GCAACACCAC
901 CTGTCAGACC CCCAAAGGCG CCATCAACAC CAGCCTGCCC TTCCAGAACA
951 TCCACCCCAT CACCATCGGC AAGTGCCCTA AGTACGTGAA GTCTACCAAG
1001 CTGAGGCTGG CCACAGGCCT GCGGAACATC CCCAGCATCC AGAGCAGAGG
1051 CCTGTTTGGC GCCATTGCCG GCTTTATCGA GGGCGGCTGG ACCGGAATGG
1101 TGGATGGATG GTATGGCTAC CACCACCAGA ATGAGCAGGG AAGCGGCTAC
1151 GCCGCCGACC TGAAGTCCAC ACAGAACGCC ATCGACGAGA TCACCAACAA
1201 AGTGA ACTCA GTGATCGAGA AGATGAACAC CCAGTTCACC GCCGTGGGCA
1251 AAGAATTCAA CCACCTGGAA AAGCGGATCG AGAACCTGAA CAAGAAGGTG
1301 GACGACGGCT TCCTGGACAT CTGGACCTAC AACGCCGAGC TGCTCGTGCT
1351 GCTGGAAAAC GAGCGGACCC TGGACTACCA CGACTCCAAC GTGAAGAATC
1401 TGTACGAGAA AGTTCGCTCC CAGCTGAAGA ACAACGCCAA AGAGATCGGC
1451 AACGGCTGCT TCGAGTTCTA CCACAAGTGC GACAACACCT GTATGGAAAG
1501 CGTGAAGAAC GGCACCTACG ACTACCCCAA GTACAGCGAG GAAGCCAAGC
1551 TGAACCGGGA AGAGATCGAC GGCCTGGATA TCAGATCTCT GGTGCCAAGA
1601 GGATCTCCAG GATCTGGATA CATCCCAGAG GCTCCAAGAG ATGGACAAGC
1651 TTACGTGAGA AAGGACGGAG AGTGGGTGCT GCTGTCTACT TTCCTGGGAC
1701 ACCACCACCA CCACCACTAA

```

(SEQ ID NO: 7)

[0140] Se empleó un análisis de inhibición de la hemaglutinación para detectar si los antisueros de la vacunación H1 (cepa de la vacuna A(H1N1) pandémica 2009) puede inhibir la capacidad del virus WSN (H1N1) de aglutinar glóbulos rojos. Como se muestra en Figura 18A, antisueros de la vacunación con HA mono-glucosilada (HA_{mg}) de H1 (cepa de la vacuna A(H1N1) pandémica 2009) demostraron una mejor aptitud de inhibir la capacidad del virus WSN (H1N1) de aglutinar glóbulos rojos que HA completamente glucosilada (HA_{fg}) y HA no glucosilada HA (HA_{ug}).

[0141] Se utilizó un análisis de microneutralización para detectar si antisueros de la vacuna H1 (cepa de la vacuna A(H1N1) pandémica 2009) pueden neutralizar la capacidad del virus WSN (H1N1) de infectar células MDCK. Como se muestra en Figura 18B, HA mono-glucosilada (HA_{mg}) de H1 (cepa de la vacuna A(H1N1) pandémica 2009) demostró una mejor aptitud de neutralizar la capacidad del virus WSN (H1N1) de infectar células MDCK que HA completamente glucosilada (HA_{fg}) y HA no glucosilada (HA_{ug}).

[0142] Se empleó un experimento de exposición a virus para demostrar que la vacunación con HA mono-glucosilada de H1 (cepa de la vacuna A(H1N1) pandémica 2009) puede proteger contra la exposición al virus (H1N1) 1933 o A/Puerto Rico/8/34 (H1N1): PR8. La HA mono-glucosilada (cepa de la vacuna A(H1N1) pandémica 2009) como vacuna protege ratones BALB/c de la exposición por el virus WSN (H1N1) o PR8. Por contraste, HA completamente glucosilada, que está presente en vacunas tradicionales contra la gripe, hechas de virus inactivados, no revela capacidad protectora cruzada contra la infección por virus WSN (H1N1) o PR8.

[0143] HA parcialmente glucosilada (v.g., mono-glucosilada) de otras cepas del virus de la gripe puede usarse igualmente para formular vacunas potentes, activas en prevenir o reducir infecciones por una o más cepas o

subtipos del virus de la gripe. La secuencia codificante de HA de la gripe de cualquier número puede aislarse y modificarse para expresión como se describe en Ejemplo 1. La HA se clona entonces y se expresa en un sistema de expresión eucariota y se somete luego a desglucosilación para retener una a tres glucosilaciones (preferiblemente mono-glucosiladas) en un sitio de glucosilación.

[0144] Tabla 4 muestra la secuencia de consenso de H1 A del-TM-FH6 modificada en donde la secuencia peptídica señal está subrayada y en negrita, el sitio de escisión de trombina está en cursiva, la secuencia de trimerización foldon de fibrina del bacteriófago T4 y el His-tag están subrayados, y la secuencia conectora está en negrita y subrayada.

Tabla 4. Secuencia de consenso de la hemaglutinina H1-A del-TM-FH6

Secuencia de aminoácidos de consenso de la hemaglutinina H1-A del-TM-FH6 de la gripe	
<u>MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTD</u> TVDTVLEKNVTVTHSVNLL	50
EDSHNGKLCLLKGIAPLQLGNCSVAGWILGNPECELLISKESWSYIVETP	100
NPENGTCYPGYFADYEELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHTVTKGVS	150
ASCSHNGKSSFYRNLLWLTGKNGLYPNLSKSYANNKEKEVLVLWGVHHP	200
NIGDQRALYHTENAYVSVVSSHYSRRFTPEIAKRPKVRDQEGRINYWTL	250
LEPGDTIIFEANGNLIAPRYAFALSRGFGSGIITSNAPMDECDACQTPQ	300
GAINSSLPFQNVHPVTIGECPKYVRSTKLRMVTGLRNIPSIQSRGLFGAI	350
AGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVI	400
EKMNTQFTAVGKEFNKLERRMENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENER	450
TLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECME SVKNGT	500
YDYPKYSEESKLNREKIDGV <u>DIRS</u> <u>LVPRGS</u> <u>PGSGYIPEAPRDGQAYVRKD</u>	550
<u>GEWVLLSTFLGHHHHH</u>	(SEQ ID NO: 8)

Secuencia nucleotídica de la hemaglutinina H1-A del-TM-FH6 de la gripe

```

1  ATGAAGGTGA  AACTGCTGGT  GCTGCTGTGC  ACCTTCACCG  CCACCTACGC
51  CGACACCATC  TGCATCGGCT  ACCACGCCAA  CAACAGCACC  GACACCGTGG
101 ATACCGTGCT  GGAAAAGAAC  GTGACCGTGA  CCCACAGCGT  GAACCTGCTG
151 GAAGATAGCC  ACAACGGCAA  GCTGTGCCTG  CTGAAGGGCA  TTGCCCCCCT
201 GCAGCTGGGC  AACTGTAGCG  TGGCCGGCTG  GATTCTGGGC  AACCCCGAGT
251 GCGAGCTGCT  GATCAGCAAA  GAGTCCTGGT  CCTACATCGT  GGAGACACCC
301 AACCCCGAGA  ACGGCACCTG  TTACCCCGGC  TACTTCGCCG  ACTACGAGGA
351 ACTGAGAGAG  CAGCTGTCCT  CTGTCTCCAG  CTTGAGCGG  TTCGAGATCT
401 TCCCCAAAGA  GAGCAGCTGG  CCCAACCACA  CCGTGACAAA  GGGCGTGAGC
451 GCCAGCTGCT  CCCACAATGG  CAAGAGCAGC  TTCTACCGGA  ACCTGCTGTG
501 GCTGACCGGC  AAGAACGGCC  TGTACCCCAA  CCTGAGCAAG  AGCTATGCCA
551 ACAACAAAGA  GAAAGAGGTC  CTCGTCCTCT  GGGGCGTGCA  CCACCCCCCC
601 AACATCGGCG  ACCAGCGGGC  CCTGTACCAC  ACCGAGAACG  CCTACGTGTC
651 CGTGGTGTCC  AGCCACTACA  GCAGACGGTT  CACCCCGAG  ATCGCCAAGA
701 GGCCCAAAGT  GCGGGACCAG  GAAGGCCGGA  TCAACTACTA  CTGGACCCTG
751 CTGGAACCCG  GCGACACCAT  CATCTTCGAG  GCCAACGGCA  ACCTGATCGC
801 CCCAGATAC  GCCTTTGCCC  TGAGCAGAGG  CTTGCGCAGC  GGCATCATCA
851 CCAGCAACGC  CCCCATGGAC  GAGTGCGACG  CCAAGTGTC  GACCCCCCAG
901 GGCGCCATCA  ACAGCAGCCT  GCCCTTCCAG  AACGTGCACC  CCGTGACCAT
951 CGGCGAGTGC  CCTAAGTACG  TGCGGAGCAC  CAAGCTGAGA  ATGGTGACCG
1001 GCCTGCGGAA  CATCCCCAGC  ATCCAGAGCA  GAGGCCTGTT  TGGCGCCATT
1051 GCCGGCTTTA  TCGAGGGCGG  CTGGACCGGA  ATGGTGGACG  GGTGGTACGG
1101 CTACCACCAC  CAGAATGAGC  AGGGCAGCGG  CTACGCCGCC  GATCAGAAGT
1151 CCACCCAGAA  CGCTATCAAC  GGCATCACCA  ACAAAGTGAA  CAGCGTGATC
1201 GAGAAGATGA  ACACCCAGTT  CACCGCCGTG  GGCAAAGAGT  TCAACAAGCT
1251 GGAACGGCGG  ATGGAAAACC  TGAACAAGAA  GGTGGACGAC  GGCTTCCTGG
1301 ACATCTGGAC  CTACAACGCC  GAGCTGCTGG  TCCTGCTGGA  AAACGAGCGG
1351 ACCCTGGACT  TCCACGACAG  CAACGTGAAG  AACCTGTACG  AGAAAGTGAA
1401 GTCCAGCTG  AAGAACAACG  CCAAAGAGAT  CGGCAACGGC  TGCTTCGAGT
1451 TCTACCACAA  GTGCAACGAC  GAGTGCATGG  AAAGCGTGAA  GAACGGCACA
1501 TACGACTACC  CCAAGTACAG  CGAGGAAAGC  AAGCTGAACC  GGGAGAAGAT
1551 CGACGGCGTG  GATATCAGAT  CTCTGGTGCC  AAGAGGATCT  CCAGGATCTG
1601 GATACATCCC  AGAGGCTCCA  AGAGATGGAC  AAGCTTACGT  GAGAAAGGAC
1651 GGAGAGTGGG  TGCTGCTGTC  TACTTTCCTG  GGACACCACC  ACCACCACCA
1701 CTAA  (SEQ ID NO: 9)

```

[0145] Tabla 5 muestra la secuencia de consenso del H1-C del-TM-FH6 modificada, en donde la secuencia peptídica señal esta subrayada y en negrita, el sitio de escisión de trombina está en cursiva, la secuencia de trimerización foldon de fibrina del bacteriófago T4 y el His-tag están subrayados, y la secuencia conectora está en negrita y subrayada.

Tabla 5. Secuencia de consenso de la hemaglutinina H1-C del-TM-FH6

Secuencia de aminoácidos de consenso de la hemaglutinina H1-C del-TM-FH6 de la gripe				
<u>MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLL</u> 50				
EDSHNGKLCLLKGIAPLQLGNCSVAGWILGNPECELLISKESWSYIVETP 100				
NPENGTCYPGHFADYEELREQLSSSVSSFERFEIFPKESSWPNHDTVTVGVS 150				
ASCSHNGESSFYRNLLWLTGKNGLYPNLSKSYANNKEKEVLVLWGVHHP 200				
NIGDQKALYHTENAYVSVVSSHYSRKFTPEIAKRPKVRDQEGRINYWTL 250				
LEPGDTIIFEANGNLIAPRYAFALSRGFGSGIINSNAPMDKCDAKCQTPQ 300				
GAINSSLPFQNVHPVTIGECPKYVRSAKLRMVTGLRNIPSIQSRGLFGAI 350				
AGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVI 400				
EKMNTQFTAVGKEFNKLERRMENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENER 450				
TLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECME SVKNGT 500				
YDYPKYSEESKLNREKIDGV <u>DIRS</u> <u>LVPRGSP</u> <u>SGSYIPEAPRDGQAYVRKD</u> 550				
<u>GEWVLLSTFLGHHHHH</u> (SEQ ID NO: 10)				
Secuencia nucleotídica de la hemaglutinina H1-C del-TM-FH6 de la gripe				
1	ATGAAGGTGA	AACTGCTGGT	GCTGCTGTGC	ACCTTCACCG CCACCTACGC
51	CGACACCATC	TGCATCGGCT	ACCACGCCAA	CAACAGCACC GACACCGTGG
101	ATACCGTGCT	GGAAAAGAAC	GTGACCGTGA	CCCACAGCGT GAACCTGCTG
151	GAAGATAGCC	ACAACGGCAA	GCTGTGCCTG	CTGAAGGGCA TTGCCCCCCT
201	GCAGCTGGGC	AACTGTAGCG	TGGCCGGCTG	GATTCTGGGC AACCCCGAGT
251	GCGAGCTGCT	GATCTCCAAA	GAGTCCTGGT	CTTACATCGT GGAGACACCC
301	AACCCCGAGA	ACGGCACCTG	TTACCCCGGC	CACTTCGCCG ACTACGAGGA
351	ACTGCGGGAG	CAGCTGAGCA	GCGTGTCCAG	CTTCGAGCGG TTCGAGATCT
401	TCCCCAAAGA	GAGCAGCTGG	CCCAACCACG	ATACCGTGAC CGGCGTGAGC
451	GCCAGCTGTT	CCCACAACGG	CGAGAGCAGC	TTCTACCGGA ACCTGCTGTG
501	GCTGACCGGC	AAGAACGGCC	TGTACCCCAA	CCTGAGCAAG AGCTATGCCA

```

551 ACAACAAAGA GAAGGAAGTC CTGGTCCTCT GGGGCGTGCA CCACCCCCC
601 AACATCGGCG ACCAGAAGGC CCTGTACCAC ACCGAGAACG CCTACGTGTC
651 CGTGGTGTCC AGCCACTACA GCCGGAAGTT CACCCCCGAG ATCGCCAAGA
701 GGCCCAAAGT GCGGGACCAG GAAGGCCGGA TCAACTACTA CTGGACCCTG
751 CTGGAACCCG GCGACACCAT CATCTTCGAG GCCAACGGCA ACCTGATCGC
801 CCCAGATAC GCCTTTGCC TGAGCAGAGG CTTCGGCAGC GGCATCATCA
851 ACAGCAACGC CCCCATGGAC AAGTGCAGC CCAAGTGCCA GACACCCAG
901 GGCGCCATCA ACAGCTCCCT GCCCTTCCAG AACGTGCACC CCGTGACCAT
951 CGGCGAGTGC CCTAAGTACG TGCGGAGCGC CAAGCTGAGA ATGGTGACCG
1001 GCCTGCGGAA CATCCCCAGC ATCCAGAGCA GAGGCCTGTT TGGCGCCATT
1051 GCCGGCTTTA TCGAGGGCGG CTGGACCGGA ATGGTGGACG GGTGGTACGG
1101 CTACCACCAC CAGAATGAGC AGGGCAGCGG CTACGCCGCC GATCAGAAGT
1151 CCACCCAGAA CGCCATCAAC GGCATCACCA ACAAAGTGAA CAGCGTGATC
1201 GAGAAGATGA ACACCCAGTT CACCGCCGTG GGCAAAGAGT TCAACAAGCT
1251 GGAACGGCGG ATGGA AAACC TGAACAAGAA GGTGGACGAC GGCTTCCTGG
1301 ACATCTGGAC CTACAACGCC GAGCTGCTGG TGCTGCTGGA AAACGAGCGG
1351 ACCCTGGACT TCCACGACAG CAACGTGAAG AACCTGTACG AGAAAGTGAA
1401 GTCCCAGCTG AAGAACAACG CCAAAGAGAT CGGCAACGGC TGCTTCGAGT
1451 TCTACCACAA GTGCAACGAC GAGTGCATGG AAAGCGTGAA GAACGGCACA
1501 TACGACTACC CCAAGTACAG CGAGGAAAGC AAGCTGAACC GGGAGAAGAT
1551 CGACGGCGTG GATATCAGAT CTCTGGTGCC AAGAGGATCT CCAGGATCTG
1601 GATACATCCC AGAGGCTCCA AGAGATGGAC AAGCTTACGT GAGAAAGGAC
1651 GGAGAGTGGG TGCTGCTGTC TACTTTCCTG GGACACCACC ACCACCACCA
1701 CTAA      (SEQ ID NO: 11)

```

[0146] Vacunas generadas de los péptidos de HA desglucosilada de la presente divulgación exhiben actividad antiviral contra virus respiratorios, incluyendo el virus respiratorio sincitial (VRS) y varios tipos de gripe, tales como gripe A y gripe B. Ventajosamente, los péptidos antivirales de la presente divulgación exhiben actividad antiviral contra numerosas cepas de gripe, incluyendo gripes estacional, aviar (v.g., cepas H5N1), y porcina. La enfermedad resultante de infecciones provocadas por estos virus puede prevenirse o tratarse también, de acuerdo con algunos de los métodos divulgados.

(C) Sitios de glucosilación en la proteína H1/HA.

[0147] Las moléculas H1 HA de la gripe tienen cuatro sitios antigénicos

distintos: Sa, Sb, Ca, y Cb (Luoh SM, et al. (1992) J Virol 66:1066-1073). Estos sitios constan de los aminoácidos más variables en la molécula HA de los virus H1N1 humanos estacionales que han sido sometidos a presión inmunitaria mediada por anticuerpos desde su aparición en 1918.

[0148] Utilizando análisis de inhibición de hemaglutinación (H1) y estudios de vacunación/exposición, se demostró que el virus H1N1 pandémico 2009 es antigénicamente similar a los virus H1N1 humanos, que circularon desde 1918-1943, y a los virus H1N1 clásicos del cerdo. Se descubrió que anticuerpos contra el tipo 1918 o vacunas H1N1 clásicas del cerdo protegían completamente ratones C57B/6 de la exposición letal con el aislado del virus A/Holanda/602/2009 de la gripe. Se descubrió que la inmunización pasiva con anticuerpos monoclonales de reacción cruzada (mAbs), desarrollados contra proteínas HA A/California/04/2009 o 1918 ofrecían completa protección contra la muerte. Análisis de mutantes de escape a anticuerpos mAb, generados por selección del virus 2009 H1N1 con estos mAbs, indican que el sitio antigénico Sa es uno de los epítomos de protección cruzada conservados. (Manicassamy B., et al. PLoS Pathogens January 2010 | Volume 6 | Issue | e1000745).

[0149] Mediante modelado de homología de la estructura HA, se ha demostrado que HAs de 2009 H1N1 y el virus pandémico 1918 comparten un número significativo de residuos de aminoácido en sitios antigénicos conocidos, sugiriendo la existencia de epítomos comunes para anticuerpos neutralizantes de reacción cruzada a las dos HAs. (Igarashi M. et al., PLoS ONE January 2010, Volume 5, Issue 1, e8553). Existe un sitio potencial de glucosilación en el residuo Asn177 en HA, el cual se encuentra dentro de la región Sa antigénicamente conservada. (Véase Fig. 19). Proteínas que llevan una mutación en el sitio de glucosilación Asn177 en la HA de Brisbane H1 se utilizan para inmunizar ratones. La protección cruzada contra NIBRG-121 está cuantificada.

[0150] Antisueros de vacunación con HA mono-glucosilada (HA_{mg}), que llevan una mutación en Asn177 de H1 (Brisbane), demuestran una mejor aptitud de inhibir la capacidad del virus NIBRG-121 de aglutinar glóbulos rojos que HA completamente glucosilada (HA_{fg}), que lleva una mutación en Asn177, y HA no glucosilada (HA_{ug}), que lleva una mutación en Asn177. HA mono-glucosilada (HA_{mg}), que lleva una mutación en Asn177 de H1 (Brisbane), demuestra una mejor aptitud de neutralizar la capacidad del virus NIBRG-121 de infectar células MDCK que HA completamente glucosilada (HA_{fg}), que lleva una mutación en Asn177, y HA no glucosilada (HA_{ug}), que lleva una mutación en Asn177. HA mono-glucosilada (Brisbane) como vacuna protege a ratones BALB/c de la exposición del virus NIBRG-121. Por contraste, HA completamente glucosilada, que lleva una mutación en Asn177, revela poca o ninguna capacidad de protección cruzada contra la infección por el virus NIBRG-121.

[0151] Tal como se emplea en esta especificación, "actividad terapéutica" o "actividad" puede referirse a una actividad cuyo efecto es consistente con un resultado terapéutico deseable en humanos, o a efectos deseados en mamíferos no humanos o en otras especies u organismos. La actividad terapéutica puede medirse *in vivo* o *in vitro*. Por ejemplo, un efecto deseable puede analizarse en un cultivo celular.

[0152] La "actividad antiviral" de una vacuna de acuerdo con la presente divulgación denota la capacidad de la vacuna de generar una respuesta inmunitaria en un sujeto, al cual se administra la vacuna, en donde la respuesta inmunitaria es suficiente para prevenir o tratar o mejorar la infección viral en toda la regla y/o síntomas asociados con infección por un virus, tal como un virus de la gripe. Ventajosamente, vacunas generadas a partir de los péptidos de HA desglucosilada de la presente divulgación pueden mostrar actividad antiviral significativa contra el virus de la gripe. Tal como se emplea en esta especificación, la "actividad antiviral significativa" puede medirse por la capacidad de la vacuna de inhibir la

hemaglutinación vírica en por lo menos alrededor de 50%, comparada con muestras tratadas con una cepa no virulenta de virus. En ciertas incorporaciones, el péptido antiviral inhibe la hemaglutinación viral en por lo menos alrededor de 60%, más preferiblemente en por lo menos alrededor de 70%, más preferiblemente en por lo menos alrededor de 80%, más preferiblemente en por lo menos alrededor de 90%, y más preferiblemente en por lo menos alrededor de 95%, comparado con muestras tratadas con una cepa no virulenta de virus.

[0153] Métodos para demostrar el efecto inhibitorio de las composiciones antivirales sobre la replicación viral son bien conocidos en el arte. La eficacia terapéutica de las vacunas de la presente invención como agentes antivirales puede demostrarse en animales de laboratorio, por ejemplo, usando un ejemplo murino. (*Véase* v.g., Jones, et al., J. Virol, 2006, Vol. 80, No. 24, pp. 11960-11967). Adicionalmente, el efecto terapéutico de los péptidos farmacológicamente activos de la presente invención puede demostrarse en humanos mediante técnicas conocidas en el arte.

[0154] Los anticuerpos neutralizantes de la presente invención pueden usarse además como una herramienta para cartografiar epítomos de determinantes antigénicos del virus de la gripe A, y son útiles en el desarrollo de vacunas. Por supuesto, como se muestra en los siguientes Ejemplos, los inventores en esta especificación han identificados varios anticuerpos neutralizantes ampliamente reactivos, que pueden utilizarse como guías para el diseño de vacunas.

[0155] Por consiguiente, los anticuerpos neutralizantes de la presente invención pueden usarse para seleccionar péptidos o polipéptidos que funcionalmente imitan los epítomos de neutralización a los que se unen los anticuerpos, los cuales, a su vez, pueden desarrollarse en vacunas contra la infección por el virus de la gripe A. En una incorporación, la presente invención provee una vacuna efectiva contra el virus de la gripe A, que

contiene un péptido o polipéptido que funcionalmente imita un epítipo de neutralización ligado por un anticuerpo descrito en esta especificación. En una incorporación, la vacuna comprende un péptido o polipéptido que imita funcionalmente un epítipo de neutralización ligado por un anticuerpo que une un antígeno hemaglutinina (HA). En otra incorporación, la vacuna puede ser sintética. En otras incorporaciones, la vacuna puede incluir (i) un virus atenuado de la gripe, o una parte del mismo; o (ii) un virus eliminado de la gripe A, o parte del mismo. En una otra incorporación, la vacuna comprende un péptido o polipéptido que imita funcionalmente un epítipo de neutralización ligado por un anticuerpo que une un antígeno hemaglutinina (HA). El antígeno HA puede ser un subtipo H5 o un subtipo H1. En algunas incorporaciones, el antígeno HA se despliega en la superficie del virus de la gripe A.

Vacunas del virus de la gripe

[0156] Las secuencias de los sitios de N-glucosilación HA H5 de la gripe están altamente conservadas. La HA H5 presenta un total de 15 sitios de N-glucosilación que tienen la secuencia prototípica N-X-(S/T). Cada monómero tiene 5 sitios de N-glucosilación en las posiciones N27, N39, N170, N181 y N500. La unión al receptor del anfitrión se afecta por glicanos en la estructura HA. HA H5 tiene sitios de glucosilación en las posiciones 39, 127, 170, 181, y 500.

[0157] Las vacunas de la invención pueden generarse usando versiones parcialmente glucosiladas de cualquier proteína de superficie del virus de la gripe, incluyendo HA, NA y M2. Las proteínas neuraminidasa (NA) del virus de la gripe A se despliegan en su superficie. La proteína M2 del virus de la gripe A es una proteína de membrana integral de 97 aminoácidos que se expresa en la superficie de células infectadas con un dominio N-terminal extracelular de 18 a 23 residuos de aminoácido, un dominio hidrófobo interno de aproximadamente 19 residuos, y un dominio citoplásmico C-

terminal de 54 residuos. (Zebedee SL, et al. J. Virol. 1988 Aug; 62(8):2762-2772).

[0158] Además, las proteínas de la gripe parcialmente glucosiladas pueden generarse alterando el patrón de glucosilación en los sitios de N- u O-glucosilación de la proteína utilizada como un antígeno.

[0159] En otra incorporación, los péptidos o polipéptidos de la vacuna contienen determinantes antigénicos que desarrollan anticuerpos neutralizantes contra el virus de la gripe A.

[0160] En un aspecto más general, las moléculas neutralizantes, incluyendo pero no limitadas a, anticuerpos, son útiles para prevenir o tratar infecciones víricas. Por consiguiente, las moléculas neutralizantes de la presente invención son útiles en inmunoterapia, tal como inmunización pasiva utilizando una o más de tales moléculas, y en el desarrollo de vacunas dirigidas a la(s) diana(s) antigénica(s) vírica(s).

[0161] La presente divulgación provee composiciones de vacuna para la prevención y tratamiento de infecciones causadas por el virus neutralizado de la gripe aviar. Aunque se ha sabido por más de 80 años que la administración pasiva de sueros inmunitarios pueden prevenir la infección (Luke, T. C. et al., Kilbane E M, Jackson J L, & Hoffman S L (2006) Ann Intern Med 145, 599-609), estudios más recientes con anticuerpos monoclonales ofrecen también estímulo (Hanson, B. J. et al. (2006) Respir Res 7, 126; Huang, C. C. et al. (2004) Proc. Nat. Acad. Sci. 101, 2706-2711; Simmons C. P. et al. (2007) PLoS Med 4, e178). Por ejemplo, Hanson et al., mostraron que un anticuerpo monoclonal contra el virus H5N1 protegía contra la infección letal, incluso cuando se administraba tres días después de la inoculación en ratones (Hanson, B. J. et al. (2006) Respir Res 7, 126).

[0162] Dada la posibilidad de una epidemia catastrófica, se ha sugerido que los gobiernos deben mantener reservas de anticuerpos neutralizantes, tales como los referidos en esta especificación. Los hechos de que los anticuerpos sean completamente humanos y se hayan aislado de individuos que combatieron exitosamente la infección viral pueden ofrecer ventajas. Sin embargo, incluso si tales anticuerpos se guardan en reserva, si el gen que codifica el epítipo al cual se une el anticuerpo fuera a mutar, entonces el anticuerpo podría ser menos efectivo. Además, existe cierta evidencia de que la inmunidad celular mejora la depuración del virus. No obstante, si el único efecto de la inmunización pasiva fuera disminuir la gravedad de la infección, dando así el tiempo necesario para que operen otros efectores inmunitarios, podría ser de importancia crítica para reducir la mortalidad en pacientes con sistemas inmunitario, cardiovascular, y respiratorio débiles y en las personas de edad avanzada. La inmunización pasiva podría prevenir la hipercitocinemia contra virus rápidamente proliferantes, como ocurrió incluso en adultos jóvenes durante el brote de gripe de 1918.

Vacunas contra el virus respiratorio sincitial (VRS)

[0163] El virus respiratorio sincitial (VRS) humano es un virus que causa infecciones de las vías respiratorias. Es la principal causa de infección de las vías respiratorias bajas y de las visitas a los hospitales durante la infancia y la niñez. El VRS es un virus ARN envuelto de la familia *Paramyxoviridae* y del género *Pneumovirus*. No existe vacuna.

[0164] El virión VRS comprende tres glucoproteínas de superficie, F, G y SH (hidrófoba pequeña - *small hydrophobic*). Las proteínas F en la superficie del virus hacen que las membranas celulares en células adyacentes se fusionen, formando sincitios. Las glucoproteínas F (fusión) y G (adhesión) se requieren para la entrada vírica en las células y determinan asimismo la respuesta de los anticuerpos. La estructura y composición del VRS se ha explicado y se describe en detalle en el libro de texto "Fields

Virology", ed. Knipe, D. M. et al., Lippincott Williams & Wilkins, NY (2001), en particular, Chapter 45, pp. 1443-1485, "Respiratory Syncytial Virus" by Collins, P., Chanock, R. M. and Murphy, B. R.

[0165] La proteína G VRS, que es 33 kDa no glucosilada, corre a aproximadamente 90 kDa cuando está completamente glucosilada (las dos glucosilaciones N- y O-enlazadas). Las proteínas F y G existen como un complejo proteínico en la superficie de células infectadas por el VRS. (Low K-W et al. Biochem. Biophys. Res. Comm. 366(2) 2008, 308-313).

[0166] Tabla 6 indica la secuencia de la glucoproteína G VRS con los sitios potenciales de N-glucosilación subrayados.

Tabla 6. Secuencia polipeptídica de la glucoproteína G VRS.

MSKNKDQRTT	KTLEKTWDTL	NHLLFISSCL	YKLNKLSIAQ	ITLSILAMII	STSLIIAAII	60
FIASANHKVT	LTTAIIQDAT	SQIKNTTPTY	LTQNPQLGIS	FSNLSETTSQ	TTTILASTTP	120
SVKSTLQSTT	VKTKNTITTK	IQPSKPTTKQ	RQNKPPNKPN	NDFHFEVFNF	VPCSICSNNP	180
TCWAICKRIP	NKKPGKTTT	KPTKKPTIKT	TKKDLKPQTT	KPKEVPTTKP	TEKPTINTTK	240
TNIRTTLLTN	NTTGNPEHTS	QKGTLHSTSS	DGNPSPSQVY	TTSEYLSQPP	SPSNTTNQ	298
(SEQ ID NO:12)						

[0167] Las glucoproteínas F y G VRS parcialmente desglucosiladas podrían ser útiles como vacunas VRS más efectivas.

Vacunas contra Flavivirus

[0168] Flavivirus es un género de la familia *Flaviviridae*. Los flavivirus son virus ARN envueltos, pequeños, que utilizan artrópodos tales como mosquitos para la transmisión a sus anfitriones vertebrados, e incluyen el virus de la fiebre amarilla (YFV - *yellow fever virus*), virus del Nilo Occidental (WNV - *West Nile virus*), virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, virus de la encefalitis japonesa (JE - *Japanese encephalitis*) y el virus del dengue 2 (Weaver SC, Barrett AD Nat. Rev. Microbiol. 2 789-801 2004). Los flavivirus constan de tres proteínas estructurales: la proteína C

de la nucleocápside, y las glucoproteínas M y E de la envoltura. La glucoproteína E es una proteína de fusión vírica de clase II que media tanto la unión como la fusión al receptor. Las proteínas de fusión vírica de clase II se encuentran en flavivirus y alphavirus.

[0169] La glucoproteína E consta de tres dominios: dominio I (dominio de dimerización) es un barril beta de 8 cadenas, dominio II (dominio central) es un dominio alargado compuesto de 12 cadenas beta y dos hélices alfa, y dominio III (dominio tipo inmunoglobulina) es un módulo tipo IgC con 10 cadenas beta. Los dominios I y II están entrelazados.

[0170] Los dímeros de la glucoproteína E 495 AA en la superficie vírica se re-agrupan irreversiblemente en trímeros competentes en fusión luego de la exposición a un pH bajo, como el que se encuentra en el entorno ácido del endosoma. La formación de trímeros resulta en un cambio conformacional que se traduce en la exposición de un bucle peptídico de fusión en la punta del dominio II, el cual se requiere en el paso de fusión para juntar las membranas vírica y celular insertándose en la membrana (Modis Y et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100 6986-91 2003).

[0171] La proteína (E) de la envoltura del virus del dengue contiene dos principales sitios de glucosilación N-enlazados, en Asn-67 y Asn-153. El sitio de glucosilación en la posición 153 está conservado en la mayoría de los flavivirus, mientras que se considera que el sitio en la posición 67 es exclusivo para los virus del dengue. Las cadenas laterales del oligosacárido N-enlazado en proteínas E del flavivirus se han asociado con morfogénesis vírica, infectividad, y tropismo. Los virus del dengue que carecen de N-glucosilación en la posición 67 muestran infección reducida de células humanas. (Mondotte JA, et al., *J. Virol.* 81(3):7136-7148 (2007)).

[0172] Tabla 7 indica la secuencia de la glucoproteína E del virus del dengue con los sitios potenciales de N-glucosilación en N-67 y N-153

subrayados.

Tabla 7. Secuencia polipeptídica de la glucoproteína E del virus del dengue.

MRCVGIGNRD	FVEGLSGATW	VDVVLEHGSC	VTTMAKNKPT	LDIELLKTEV	TNPAVLRKLC	60
IEAKISNTTT	DSRCPTQGEA	TLVEEQDANF	VCRRTFVDRG	WGNGCGLFGK	GSLLTCAKFK	120
CVTKLEGKIV	QYENLKYSVI	VTVHTGDQHQ	VGNETTEHGT	IATITPQAPM	SEIQLTDYGA	180
LTLDCSPRTG	LDFNEMVLLT	MKEKSWLVHK	QWFLDLPLPW	TSGASTSQET	WNRQDLLVTF	240
KTAHAKKQEV	VVLGSQEGAM	HTALTGATEI	QTSGTTTIFA	GHLKCRLKMD	KLTLLKGVSYV	300
MCTGSFKLEK	EVAETQHGTV	LVQVKYEGTD	APCKIPFSTQ	DEKGVTONGR	LITANPIVTD	360
KEKPVNIETE	PPFGESYIVI	GAGEKALKLS	WFKKGSSIGK	MFEATARGAR	RMAILGDTAW	420
DFGSIGGAFT	SVGKLVHQVF	GTAYGVLFSG	VSWTMKIGIG	ILLTWLGLNS	RSTSLSMTCI	480
AVGMVTLYLG	VVVQA	495				
(SEQ ID NO:13)						

[0173] Por consiguiente, la desglucosilación parcial de la glucoproteína E del virus del dengue puede usarse para generar vacunas más amplias y efectivas contra flavivirus. El resultado de la desglucosilación parcial de los dímeros de la proteína E del virus del dengue tipo 3 se muestra en el modelo descrito en Figura 21A-B. Figura 21B muestra la proteína E monoglucosilada del dengue.

[0174] El virus de la hepatitis C (VHC) es el principal agente etiológico de la infección pos-transfusión y hepatitis ambulante adquirida, distinta de A y distinta de B, que infecta probablemente 1% de la población mundial. El VHC es un miembro de la familia *Flaviviridae*, que incluye los flavivirus y los pestivirus (Miller RH & Purcell RH, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 87, 2057-2061 1990).

[0175] El genoma del virus de la hepatitis C (VHC) codifica dos glucoproteínas de la envoltura asociadas con la membrana (E1 y E2), las cuales interactúan para formar un complejo heterodimérico covalente. Las glucoproteínas del VHC, E1 y E2, están fuertemente modificadas por glucosilación N-enlazada. La proteína E1 consta de 192 aminoácidos y contiene 5 a 6 sitios de N-glucosilación, dependiendo del genotipo del VHC. La proteína E2 consta de 363 a 370 aminoácidos y contiene 9-11

sitios de N-glucosilación, dependiendo del genotipo del VHC. (Maertens G. and Stuyver L. Genotypes and genetic variation of hepatitis C virus. In: The molecular medicine of viral hepatitis. Ed: Harrison T. J. and Zuckerman A. J. 1997).

[0176] Un estudio reciente ha revelado que luego de la desglucosilación parcial con endoglucosidasa H tan sólo se utilizan cuatro de los cinco sitios potenciales de glucosilación en las posiciones de aminoácido 196, 209, 234, 305 y 325, respectivamente, de la glucoproteína E1 del VHC. Mutaciones en las posiciones N2 (196) y N3 (234) tienen sólo efectos menores en el ensamblaje del complejo E1/E2, mientras que una mutación en la posición N1 (196) y predominantemente en la posición N4 (305) reduce dramáticamente la eficiencia de la formación de complejos E1/E2 no covalentes. (Meunier JC. *et al.*, *J. Gen. Virol.* (1999), 80, 887-896.)

[0177] Tabla 8 indica la secuencia de la glucoproteína E1 de la envoltura del aislado HC-J6 del virus de la hepatitis C (Okamoto, H., et al., *J. Gen. Virol.* 72(11), 2697-2704 (1991)) con sitios potenciales de N-glucosilación en las posiciones 196, 209, 234, 305 y 325 subrayados.

Tabla 8. Secuencia polipeptídica de la glucoproteína E1 de la envoltura del virus de la hepatitis C.

AEVK	<u>N</u> ISTGY	MVTNDCT	<u>N</u> DS	ITWQLQAAVL	HVPGCV	PCEK	VG	<u>N</u> TSRCWIP	VSPNVAVQQP	252
GALTQGLRTH	IDMVVMSATL	CSALYVGDLC	GGVMLAAQMF	IVSPQH	HW	FV	QDC	<u>N</u> CSIYPG	312	
TITGHRMAWD	MM	<u>N</u> WSPTAT	MILAYAMRVP	EVIIDI	IIGGA	HWGV	MFGLAY	FSMQGAWAKV	372	
VVILL	LAAGV	DA							384	
(SEQ ID NO:14)										

[0178] Por consiguiente, la desglucosilación parcial de las glucoproteínas E1 y E2 del VHC puede utilizarse para generar vacunas más amplias y efectivas contra el VHC.

Vacunas contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)

[0179] Los virus de la inmunodeficiencia humana VIH-1 y VIH-2 y los virus relacionados de la inmunodeficiencia en simios (SIV – *simian immunodeficiency viruses*) causan la destrucción de los linfocitos CD4⁺ en sus respectivos anfitriones, resultando en el desarrollo del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA). La entrada del VIH en células anfitrionas está mediada por glucoproteínas de la envoltura vírica, las cuales se organizan en espículas oligoméricas, probablemente triméricas, desplegadas en la superficie del virión. Estos complejos de la envoltura están anclados en la membrana vírica por la glucoproteína de envoltura transmembrana gp41. La superficie de la espícula se compone principalmente de la glucoproteína de la envoltura exterior, gp120, asociada por interacciones no covalentes con cada subunidad del complejo de la glucoproteína gp41 trimérica.

[0180] La adición de cadenas de polisacáridos (N)-enlazados (es decir, glicanos) de asparagina a las glucoproteínas gp120 y gp41 de la envoltura del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) se requiere no sólo para el correcto plegamiento de la proteína, sino también puede brindar protección contra anticuerpos neutralizantes como un "blindaje glicano." (Wei X et al., Nature 422: 307-312, 2003). La glucoproteína (gp120) de superficie de la envoltura del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), que representa la interfase primaria entre el virus y el entorno del anfitrión, es una de las proteínas más fuertemente glucosiladas conocidas hasta la fecha, con casi la mitad de su peso molecular debida a la adición de glicanos N-enlazados. (Allan JS, et al. Science 228: 1091-1094, 1985.) La glucoproteína (gp41) transmembrana de la envoltura del VIH-1 es también glucosilada, pero en una menor medida. La adición de glicanos N-enlazados es esencial para que la gp120 del VIH-1 se pliegue en la conformación apropiada para unirse al receptor CD4, e influye en la unión de los co-receptores alternativos CXCR4 y CCR5, los efectos combinados que median la fusión y entrada del VIH-1 en la célula anfitriona.

[0181] Puesto que muchos glicanos N-enlazados son componentes altamente conservados de la envoltura del VIH-1, pueden constituir ellos mismos una diana prometedora para los anticuerpos neutralizantes. El anticuerpo monoclonal humano ampliamente neutralizante 2G12 se une a un epítopo que comprende glicanos N-enlazados, que se adhieren a la glucoproteína gp120. (Trloka A et al., J Virol 70: 1100-1108, 1996). Cepas de VIH-1, en las cuales se han eliminado o modificado experimentalmente sitios de glucosilación N-enlazados, pueden volverse más sensibles a neutralización (Koch et al., 2003 Virology 313: 387-400.)

[0182] La gp120 madura contiene 24 sitios potenciales para N-glucosilación, como se reconoce por la secuencia Asn-Xaa-Ser/Thr. (Kornfeld and Kornfeld, *Ann Rev. Biochem.* 54: 631-664, 1985). Tabla 9 indica los 24 sitios en la secuencia HXB2 del VIH-1. Los sitios potenciales de N-glucosilación están subrayados.

Tabla 9. Secuencia polipeptídica de la gp120 del VIH.

LWVTVYYGVP	VWKEATITLF	CASDAKAYDT	EVHNVWATHA	CVPTDPNPQE	VVLVNVTENF	60
NMWKNDMVEQ	MHEDIISLWD	QSLKPCVKLT	PLCVSLKCTD	LKNDTNTNSS	SGRMIMEKGE	120
IKNCSFNIST	SIRGKVQKEY	AFYKLDIIP	IDNDTTSYKL	TSCNTSVITQ	ACPKVSFEPI	180
PIHYCAPAGF	AILKCNNKTF	NGTGPCTNVS	TVQCTHGIRP	VVSTQLLNLG	SLAEEEVVIR	240
SVNFTDNAKT	IIVQLNISVE	INCTRPNNNT	RKRIRIQRGP	GRAFVTIGKI	GNMRQAHCNI	300
SRAKWNNTLK	QIASKLREQF	GNNKTIIFKQ	SSGGDPEIVT	HSFNCGGEFF	YCNSTQLFNS	360
TWFNSTWSTE	GSNNTEGSDT	ITLPCRIKQI	INMWQKVGKA	MYAPPISGQI	RCSSNITGLL	420
LTRDGGNSNN	ESEIFRPGGG	DMRDNRSEL	YKYKVVKIEP	LGVAPTKAKR	RVVQREKR478	
(SEQ ID NO:15)						

[0183] En la glucoproteína gp41 transmembrana del VIH-1, los sitios de glucosilación conservados están en Asn621, Asn630 y Asn642.

[0184] Por consiguiente, la desglucosilación parcial de la proteína gp120 de la envoltura del VIH, o la proteína gp41 transmembrana pueden utilizarse para generar vacunas más amplias y efectivas contra flavivirus. El resultado de la desglucosilación parcial de los trímeros de la proteína gp120 del VIH se muestra en el modelo representado en Figuras 20A-B. Figura 20B

muestra trímeros de la proteína gp120 monoglucosilada del VIH.

Métodos para elaborar glucoproteínas de superficie celular parcialmente glucosiladas

[0185] Polinucleótidos de la presente invención, o sus fragmentos o variantes, se preparan fácilmente, por ejemplo, sintetizando directamente el fragmento por medios químicos, como se practica comúnmente utilizando un sintetizador automático de oligonucleótidos. Además, se obtienen fragmentos por aplicación de tecnología de reproducción de ácido nucleico, tal como la tecnología PCR™ de la Patente de los Estados Unidos 4,683,202, introduciendo secuencias seleccionadas en vectores recombinantes para producción recombinante, y por otras técnicas de ADN recombinante conocidas generalmente por las personas de habilidad en el arte de la biología molecular.

[0186] La invención provee vectores y células anfitrionas que comprenden un ácido nucleico de la presente invención, así como técnicas recombinantes para la producción de un polipéptido de la presente invención. Vectores de la invención incluyen aquellos capaces de replicación en cualquier tipo de célula u organismo, incluyendo, v.g., plásmidos, bacteriófagos, cósmidos, y minicromosomas. En varias incorporaciones, vectores que incluyen un polinucleótido de la presente invención son vectores apropiados para propagación o replicación del polinucleótido, o vectores adecuados para expresar un polipéptido de la presente invención. Tales vectores son conocidos en el arte y se encuentran disponibles en el comercio.

[0187] Polinucleótidos de la presente invención pueden sintetizarse, en todo o en partes, que se combinan e insertan en un vector utilizando técnicas rutinarias de biología celular y molecular, incluyendo, v.g., subclonando el polinucleótido en un vector linearizado usando sitios de restricción

apropiados y enzimas de restricción. Polinucleótidos de la presente invención se amplifican por reacción en cadena de la polimerasa empleando cebadores de oligonucleótidos complementarios a cada cadena del polinucleótido. Estos cebadores incluyen asimismo sitios de escisión con enzimas de restricción para facilitar la subclonación en un vector. Los componentes replicables del vector incluyen generalmente, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, y uno o más marcadores o genes seleccionables.

[0188] Con el fin de expresar un polipéptido de la presente invención, las secuencias nucleotídicas que codifican el polipéptido, o equivalentes funcionales, se insertan en vector de expresión apropiado, es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante insertada. Métodos bien conocidos por las personas expertas en el arte se utilizan para construir vectores de expresión que contienen secuencias que codifican un polipéptido de interés y elementos apropiados de control de transcripción y traducción. Estos métodos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas, y recombinación genética *in vivo*. Tales técnicas se describen, por ejemplo, en Sambrook, J., et al. (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y., y Ausubel, F. M. et al. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York. N.Y.

[0189] Una variedad de sistemas de vector de expresión/anfitrión se utilizan para contener y expresar secuencias polinucleotídicas. Éstos incluyen, pero no se limitan a, microorganismos tales como bacterias transformadas con vectores de expresión de ADN recombinante, bacteriófago, plásmido, o cósmido; levadura transformada con vectores de expresión de levadura; sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión de virus (v.g., baculovirus); sistemas de células vegetales transformadas con vectores de expresión de virus (v.g., virus del mosaico de la coliflor,

CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV - *tobacco mosaic virus*) o con vectores de expresión bacterianos (v.g., los plásmidos Ti o pBR322); o sistemas celulares animales.

[0190] Una variedad de secuencias promotoras son conocidas para eucariotas y algunas se utilizan de acuerdo con la presente invención. Virtualmente todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente 25 a 30 bases corriente arriba del sitio en donde se inicia la transcripción. Otra secuencia encontrada 70 a 80 bases corriente arriba del inicio de transcripción de muchos genes es una región CNCAAT en donde N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los eucariotas se encuentra una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de de la cola poli A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan apropiadamente en vectores de expresión eucariotas.

[0191] En sistemas de células mamíferas, se prefieren promotores de genes mamíferos o de virus mamíferos. La expresión de polipéptidos de vectores en células de anfitriones mamíferos se controlan, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus, tal como el poliomavirus, el virus de la viruela aviar, adenovirus (v.g., adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus (CMV), un retrovirus, virus de la hepatitis B y, muy preferiblemente, virus de los simios 40 (SV40 - *Simian Virus 40*), de promotores mamíferos heterólogos, v.g., el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, y de promotores de choque térmico, siempre y cuando tales promotores sean compatibles con los sistemas celulares del anfitrión. Si es necesario generar una línea celular que contenga copias múltiples de la secuencia que codifica un polipéptido, pueden usarse ventajosamente vectores basados en SV40 o EBV con un marcador apropiado seleccionable. Un ejemplo de un vector de expresión apropiado es pcDNA-3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA), el cual incluye un promotor CMV.

[0192] Un número de sistemas de expresión a base de virus se encuentran disponibles para expresión mamífera de polipéptidos. Por ejemplo, en casos en los que se utiliza un adenovirus como un vector de expresión, secuencias que codifican un polipéptido de interés pueden ligarse en un complejo de transcripción/traducción de adenovirus, compuesto por la secuencia líder tripartita y un promotor tardío. La inserción en una región E1 o E3 no esencial del genoma vírico puede utilizarse para obtener un virus viable que sea capaz de expresar el polipéptido en células del anfitrión infectado (Logan, J. and Shenk, T. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81:3655-3659). Adicionalmente, potenciadores de transcripción, tales como el virus de sarcoma de Rous (RSV - *Rous sarcoma virus*), pueden usarse para aumentar la expresión en células de anfitrión mamífero.

[0193] En sistemas bacterianos, cualquier número de vectores de expresión se seleccionan dependiendo del uso previsto para el polipéptido expresado. Por ejemplo, cuando se desean grandes cantidades, se emplean vectores que dirigen expresión de alto nivel de proteínas de fusión que se purifican fácilmente. Tales vectores incluyen, pero no se limitan a, los vectores multifuncionales de clonación y expresión de *E. coli*, tales como BLUESCRIPT (Stratagene), en el cual la secuencia que codifica el polipéptido de interés puede ligarse en el vector en marco con secuencias para la Met amino-terminal y los 7 residuos subsiguientes de β -galactosidasa, de manera que se produzca una proteína híbrida; vectores pIN (Van Heeke, G. and S. M. Schuster (1989) J. Biol. Chem. 264:5503-5509); y similares. Vectores pGEX (Promega, Madison, WI) se emplean asimismo para expresar polipéptidos extraños como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, tales proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente de células lisadas mediante adsorción a microesferas de glutatión-agarosa, seguida por elución en la presencia de glutatión libre. Proteínas elaboradas en tales sistemas se diseñan para incluir heparina, trombina, o sitios de escisión de proteasa del

factor XA, de manera que el polipéptido clonado de interés puede liberarse a voluntad de la fracción GST.

[0194] En la levadura, *Saccharomyces cerevisiae*, se usan un número de vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles, tales como el factor α , alcohol oxidasa, y PGH. Ejemplos de otras secuencias promotoras apropiadas para uso con anfitriones de levadura incluyen los promotores para la 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glicolíticas, tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexocinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato cinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa, y glucocinasa. Para recapitulaciones, véase Ausubel *et al.* (*supra*) and Grant *et al.* (1987) *Methods Enzymol.* 153:516-544. Otros promotores de levadura, que son promotores inducibles con la ventaja adicional de transcripción controlada por condiciones de crecimiento, incluyen las regiones promotoras para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradadoras asociadas con el metabolismo del nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Vectores y promotores apropiados para uso en la expresión en levadura se describen además en EP 73,657. La expresión de proteínas de superficie de VHC glucosiladas en levadura se divulga en WO 96/04385. Potenciadores de levaduras se utilizan también ventajosamente con promotores de levadura.

[0195] En casos en los que se emplean vectores de expresión vegetales, la expresión de secuencias que codifican polipéptidos se induce por cualquiera de un número de promotores. Por ejemplo, promotores víricos tales como los promotores 35S y 19S del CaMV se usan solos o en combinación con la secuencia líder omega del TMV (Takamatsu, N. (1987) *EMBO J.* 6:307-311. Alternativamente, se utilizan promotores vegetales tales como la subunidad pequeña de RUBISCO o los promotores de choque térmico

(Coruzzi, G. et al. (1984) EMBO J. 3:1671-1680; Broglie, R. et al. (1984) Science 224:838-843; and Winter, J., et al. (1991) Results Probl. Cell Differ. 77:85-105). Estos constructos pueden introducirse en células vegetales mediante transformación directa de ADN o transfección mediada por patógenos. Tales técnicas se describen en un número de recapitulaciones generalmente disponibles (véase, v.g., Hobbs, S. or Murry, L. E. in McGraw Hill Yearbook of Science and Technology (1992) McGraw Hill, New York, N.Y.; pp. 191-196).

[0196] Se usa igualmente un sistema de insecto para expresar un polipéptido de interés. Por ejemplo, en un sistema similar, se emplea el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como vector para expresar genes extraños en células de *Spodoptera frugiperda* o en larvas de *Trichoplusia*. Las secuencias que codifican el polipéptido se clonan en una región no esencial del virus, tal como el gen de la polihedrina, y se ponen bajo control del promotor de la polihedrina. La inserción exitosa de la secuencia que codifica el polipéptido inactiva el gen de la polihedrina y produce un virus recombinante que carece de cápside. Los virus recombinantes se usan entonces para infectar, por ejemplo, células de *S. frugiperda* o larvas de *Trichoplusia*, en las cuales se expresa el polipéptido de interés (Engelhard, E. K. et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. 91:3224-3227).

[0197] La desglucosilación parcial de glucoproteínas de superficie recombinantes puede llevarse a cabo mediante el uso controlado de combinaciones de varias glucosidasas, tales como tratar con neuraminidasa para eliminar el ácido siálico, con α -1-manosidasa (Sigma) para escindir residuos de manosa externos, o con endo F-N glicanoasa ((Boehringer Mannheim Biochemicals, Mannheim, Alemania), la cual escinde eficientemente glicanos de complejo y alta manosa N-enlazados.

[0198] Los péptidos HA de la presente invención pueden sintetizarse

igualmente por procesos que incorporan métodos empleados comúnmente en la síntesis peptídica, tales como acoplamiento de solución clásica de residuos de aminoácido y/o fragmentos de péptido, y, si se desea, técnicas de fase sólida. Puede usarse cualquier medio para síntesis peptídica bien conocida en el arte, por ejemplo, Schroeder and Lubke, in "The Peptides", Vol. 1, Academic Press, New York, N.Y., pp. 2-128 (1965); "The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology", (E. Gross et al., Eds.), Academic Press, New York, N.Y., Vol. 1-8, (1979-1987); Stewart and Young, in "Solid Phase Peptide Synthesis", 2nd Ed., Pierce Chem. Co., Rockford, 111. (1984); Wild et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 10537 (1992); and Rimsky et al., J Virol, 72: 986 (1998); Chan & White in "Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach", Oxford University Press, (2000). En algunas incorporaciones, pueden sintetizarse glicopéptidos utilizando aminoácidos glucosilados, de manera que esos aminoácidos glucosilados, tales como GlcNAc-Asn (V-Labs, Covington, LA), se incorporen en los sitios de glucosilación apropiados del péptido.

[0199] Vacunas de la presente divulgación pueden emplearse como un agente antiviral administrando el péptido tópicamente, por vía intranasal, o mediante administración parenteral, tal como mediante inyección subcutánea, inyección intra-muscular, inyección intravenosa, inyección intraperitoneal, o inyección intra-dérmica, a un animal de sangre caliente, v.g., humanos, caballos, otros mamíferos, etc. Los péptidos antivirales pueden usarse individualmente o en combinación. Adicionalmente, el péptido antiviral puede administrarse solo o como parte de una composición, que incluye además uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, cuya proporción se determina por la solubilidad y naturaleza química del péptido, la vía elegida de administración y la administración biológica estándar. Puesto que los péptidos de acuerdo con la invención pueden reconocer proteínas en las superficies del virus y/o la célula, para garantizar la eficacia, el portador en tales formulaciones debe estar libre o sustancialmente libre (v.g., mejor que el 90, 95, 98, o 99% en peso) de

proteínas que se unan a los péptidos.

Composiciones farmacéuticas

[0200] De acuerdo con otro aspecto, las vacunas y proteínas desglucosiladas de la presente divulgación pueden incluirse en una composición farmacéutica o alimenticia funcional o formulación, junto con agentes activos adicionales, portadores, vehículos, coadyuvantes, excipientes, o agentes auxiliares identificables por una persona de habilidad en el arte, luego de leer la presente divulgación.

[0201] Las vacunas de la presente divulgación incluirán ventajosamente un péptido coadyuvante en una cantidad coadyuvante efectiva. Como será evidente para una persona experta en el arte, la concentración óptima del péptido o péptidos coadyuvantes dependerá necesariamente del péptido(s) específico(s) utilizado(s), las características del paciente, el inmunógeno empleado, y la naturaleza de la infección viral para la cual se busca el tratamiento o profilaxis. Estos factores pueden determinarse por las personas expertas en las artes médica y farmacéutica a la luz de la presente divulgación. En general, los péptidos coadyuvantes se administran muy deseablemente en un nivel de concentración que proporcionará generalmente actividad coadyuvante, sin ocasionar efectos secundarios nocivos o perjudiciales. Generalmente, se desea una cantidad coadyuvante efectiva. Una cantidad coadyuvante efectiva se refiere a una cantidad de un péptido coadyuvante que es capaz de estimular una respuesta inmunitaria a un inmunógeno administrado.

[0202] Coadyuvantes apropiados para inclusión en las composiciones de la presente divulgación incluyen aquellos que son bien conocidos en el arte, tales como el coadyuvante completo de Freund (CFA - *complete Freund's adjuvant*), que no se utiliza en humanos, el coadyuvante incompleto de Freund (IFA - *incomplete Freund's adjuvant*), escualeno, escualano,

alumbre, y varios aceites, todos los cuales son bien conocidos en el arte, y se encuentran disponibles en el comercio de varias fuentes, tales como Novartis (v.g., coadyuvante MF59).

[0203] Las composiciones farmacéuticas o alimenticias funcionales incluyen preferiblemente por lo menos un portador farmacéuticamente aceptable. En tales composiciones farmacéuticas, la vacuna o proteína desglucosilada forma el "compuesto activo," también denominado como el "agente activo." Tal como se emplea en esta especificación, la expresión "portador farmacéuticamente aceptable" incluye disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. Igualmente pueden incorporarse compuestos activos suplementarios en las composiciones. Una composición farmacéutica se formula para que sea compatible con su vía prevista de administración. Ejemplos de vías de administración incluyen administración parenteral, v.g., intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (v.g., inhalación), transdérmica (tópica), transmucosal, y rectal. Soluciones o suspensiones utilizadas para aplicación parenteral, intradérmica, o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites no volátiles, polietilén glicoles, glicerina, propilén glicol, u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; amortiguadores tales como acetatos, citratos, o fosfatos y agentes para el ajuste de tonicidad, tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede envasarse en ampolletas, jeringas desechables, o frasquitos de dosis múltiple, fabricados de vidrio o plástico.

[0204] Portadores apropiados, farmacéuticamente aceptables, para las

composiciones que contienen los péptidos se describen en los textos farmacéuticos estándar. Véase, v.g., "Remington's Pharmaceutical Sciences", 18th Ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1990). Ejemplos específicos no limitantes de portadores apropiados, farmacéuticamente aceptables, incluyen agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol, o similares y combinaciones de los anteriores. Además, si se desea, la composición puede contener también cantidades menores de sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes amortiguadores de pH, que mejoren la efectividad antiviral de la composición.

[0205] Sujeto, tal como se emplea en esta especificación, se refiere a humanos y primates no humanos (v.g. gorila, macaco, mono titi), ganado (v.g., ovejas, vacas, caballos, asnos, y cerdos), animales de compañía (v.g., perro, gatos), animales de experimentación en laboratorios (v.g., ratones, conejos, ratas, conejillos de Indias, hámsteres), animales salvajes en cautiverio (v.g., zorros, ciervos), y cualesquiera otros organismos que puedan beneficiarse de los agentes de la presente divulgación. No existe limitación sobre el tipo de animal que podría beneficiarse de los agentes descritos en la actualidad. Un sujeto, sin importar si es o no un organismo humano o no humano, puede denominarse un paciente, individuo, animal, anfitrión, o destinatario.

[0206] Para administración parenteral, los péptidos de la presente divulgación o las vacunas obtenidas a partir de ellos pueden administrarse mediante inyección intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, o intradérmica, solos o en composiciones, que contengan además portadores farmacéuticamente aceptados. Para administración mediante inyección, se prefiere utilizar el péptido antiviral en solución en un vehículo acuoso estéril, el cual puede contener igualmente otros solutos tales como amortiguadores o preservantes, así como cantidades suficientes de sales farmacéuticamente aceptables o de glucosa para hacer la solución isotónica.

Los péptidos antivirales de la presente divulgación pueden obtenerse en la forma de sales terapéuticamente aceptables, las cuales son bien conocidas en el arte.

[0207] Composiciones farmacéuticas apropiadas para un uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones inyectables estériles o dispersión. Para administración intravenosa, portadores apropiados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina amortiguada con fosfato (PBS - *phosphate buffered saline*). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una jeringabilidad fácil. Debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y preservarse de la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilen glicol, y polietilen glicol líquido, y similares), y mezclas apropiadas de los anteriores.

[0208] La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de surfactantes. La prevención de la acción de microorganismos puede lograrse por varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede producirse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

[0209] Soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando la

composición activa en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con un ingrediente o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguida por esterilización mediante filtración. Generalmente, se preparan dispersiones incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril, que contiene un medio de dispersión básico, y los demás ingredientes requeridos entre los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación incluyen secamiento en vacío y liofilización, lo cual produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente esterilizada por filtración.

[0210] Las vacunas pueden administrarse asimismo por vía oral. Las composiciones orales incluyen generalmente un diluyente inerte o un portador comestible. Para el propósito de la administración terapéutica oral, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes y usarse en la forma de comprimidos, pastillas para chupar, o cápsulas, v.g., cápsulas de gelatina. Las composiciones orales pueden prepararse igualmente utilizando un portador fluido para uso como un enjuague bucal. Agentes aglutinantes farmacéuticamente compatibles, o materiales coadyuvantes pueden incluirse como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, pastillas para chupar, y similares, pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante, tal como celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina; un excipiente, tal como almidón o lactosa, un agente desagregante, tal como ácido algínico, Primogel, o almidón de maíz; un lubricante, tal como estearato de magnesio o Sterotes; un agente suavizante, tal como dióxido de silicio coloidal; un agente endulzante, tal como sacarosa o sacarina; o un agente saborizante, tal como menta, salicilato de metilo, o saborizante de naranja.

[0211] Puesto que los péptidos y vacunas de la presente divulgación han

mostrado actividad contra virus respiratorios, pueden administrarse también localmente al sistema respiratorio, por ejemplo a la nariz, los senos nasales, las membranas de los senos nasales o los pulmones. El(los) péptido(s), vacunas, o composiciones farmacéuticas que contienen uno o más péptidos o vacunas, pueden administrarse al sistema respiratorio en cualquier manera apropiada, tal como mediante inhalación a través de la boca o intranasalmente. Las presentes composiciones pueden dispensarse como un atomizador nasal líquido o en polvo, suspensión, gotas para la nariz, un gel o ungüento, a través de un tubo o catéter, mediante jeringa, mediante parche, mediante compresa o apósito, o mediante infusión submucosal. Los péptidos o vacunas pueden administrarse convenientemente en la forma de un atomizador en aerosol, utilizando un envase a presión o un nebulizador y un propelente apropiado, v.g., sin limitación, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano o anhídrido carbónico. En el caso de un aerosol a presión, la unidad de dosificación puede controlarse proporcionando una válvula para dispensar una cantidad medida. Pueden formularse cápsulas y cartuchos, por ejemplo, de gelatina para uso en un inhalador o insuflador, que contengan una mezcla de polvo del péptido y una base en polvo apropiada, tal como lactosa o almidón. Ejemplos de formulaciones intranasales y métodos de administración pueden encontrarse en las Publicaciones PCT WO 01/41782, WO 00/33813, y las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,180,603; 6,313,093; y 5,624,898. Las Patentes de los Estados Unidos, que se acaban de citar, se incorporan en esta especificación por referencia y para todos los propósitos. Un propelente para una formulación en aerosol puede incluir aire comprimido, nitrógeno, anhídrido carbónico, o un disolvente con bajo punto de ebullición a base de hidrocarburo. Los péptidos o vacunas de la presente divulgación pueden administrarse convenientemente en la forma de una presentación de atomizador en aerosol de un nebulizador o similar. En algunos aspectos, los ingredientes activos se micronizan apropiadamente con el fin de permitir la inhalación de sustancialmente todos los ingredientes activos a los pulmones luego de la administración de la formulación en polvo seco; por

consiguiente, los ingredientes activos tendrán un tamaño de partícula de menos de 100 micrones, deseablemente menos de 20 micrones y, preferiblemente, en el rango de 1 a 10 micrones. En una incorporación, uno o más de los péptidos o vacunas se empacan en un dispositivo que puede dispensar una cantidad predeterminada, y generalmente efectiva, del péptido mediante inhalación, por ejemplo un atomizador nasal o inhalador.

[0212] La administración sistémica puede ser también transmucosal o transdérmica. Para administración transmucosal o transdérmica, se utilizan en la formulación agentes de penetración a la barrera que se va a permear. Tales agentes de penetración son generalmente conocidos en el arte, e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosal, detergentes, sales biliares, y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosal puede llevarse a cabo mediante el uso de atomizadores nasales o supositorios. Para administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en ungüentos, pomadas, geles, o cremas, como se conoce generalmente en el arte. Los compuestos pueden prepararse asimismo en la forma de supositorios (v.g., con bases convencionales para supositorios, tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para aplicación rectal.

[0213] De acuerdo con las implementaciones, los compuestos activos se preparan con portadores que protegerán el compuesto contra la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de administración microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como acetato vinílico de etileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Métodos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes a las personas expertas en el arte. Los materiales pueden obtenerse además comercialmente de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Suspensiones liposómicas (incluyendo liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales a

antígenos específicos de las células) pueden emplearse igualmente como portadores farmacéuticamente aceptables. Éstos pueden prepararse de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en el arte, por ejemplo, como se describe en la Patente de los Estados Unidos No.4,522,811, la cual se incorpora en esta especificación por referencia.

[0214] Es ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma farmacéutica unitaria para facilidad de administración y uniformidad de la dosificación. Una forma farmacéutica unitaria, tal como se emplea en esta especificación, se refiere a unidades físicamente discretas, apropiadas como dosis unitarias para el sujeto por tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo, calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido.

[0215] Se observará por las personas expertas en el arte que la referencia en esta especificación a tratamiento se amplía a profilaxis, así como al tratamiento de infecciones establecidas o síntomas. Los péptidos y vacunas de la presente divulgación pueden administrarse terapéutica o profilácticamente. El tratamiento se comienza preferiblemente antes o en el momento de la infección, o en el momento en que el mamífero esté expuesto a un virus que es capaz de causar una infección viral respiratoria, y se continúa hasta que el virus ya no está presente o activo en las vías respiratorias. No obstante, el tratamiento puede comenzarse también pos-infección, después de que el mamífero ha estado expuesto a un virus, que es capaz de causar una infección respiratoria vírica, o después de la aparición de síntomas establecidos de infección.

[0216] Se observará además que la cantidad de un péptido antiviral de la presente divulgación, que es útil en el tratamiento o prevención de gripe, variará no sólo con el péptido particular seleccionado, sino también con la vía de administración, la naturaleza de la afección que se está tratando, y la

edad y estado del paciente y, en última instancia, estará a la discreción del médico o veterinario que tiene a su cargo el cuidado del paciente. En general, sin embargo, una dosis apropiada estará en el rango de desde alrededor de 0.01 a 750 mg/kg del peso corporal al día, preferiblemente en el rango de 0.1 a 100 mg/kg/día, muy preferiblemente en el rango de 0.5 a 25 mg/kg/día.

[0217] El péptido o vacuna puede administrarse convenientemente en una forma farmacéutica unitaria, por ejemplo, que contenga 10 a 1500 mg, convenientemente 20 a 1000 mg, muy convenientemente 50 a 700 mg de ingrediente activo por forma farmacéutica unitaria, v.g. 1 mg/kg equivale a 75 mg/75 kg de peso corporal.

[0218] Preferiblemente, la concentración de inmunógeno para cada cepa del virus de la gripe para inclusión en la vacuna es una cantidad que induce una respuesta inmunitaria, sin efectos secundarios adversos significativos. Tal cantidad variará dependiendo de cuál inmunógeno se utiliza y el tipo y cantidad del péptido coadyuvante incluido en la vacuna. Normalmente, una vacuna incluirá un inmunógeno en una cantidad de desde alrededor de 1 a alrededor de 1000 μg por ml, más preferiblemente desde alrededor de 3 a alrededor de 300 μg por ml y, muy preferiblemente, alrededor de 10 μg a alrededor de 15 μg por ml, medido por análisis SRD. Luego de una vacunación inicial, los sujetos que están siendo vacunados pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo, espaciadas adecuadamente a partir de entonces.

[0219] La toxicidad y eficacia terapéutica de tales composiciones puede determinarse por procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales de experimentación, v.g., para determinar la LD_{50} (la dosis letal al 50% de la población) y la ED_{50} (la dosis terapéuticamente efectiva en 50% de la población). La relación de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y éste puede expresarse como la

relación LD_{50}/ED_{50} . Se prefieren compuestos que exhiben índices terapéuticos elevados. Aunque pueden emplearse compuestos que presentan efectos secundarios tóxicos, debe tenerse cuidado en diseñar un sistema de aplicación que dirija tales compuestos al sitio de localización afectado para minimizar el daño potencial a células no infectadas y, en esa forma, reducir los efectos secundarios.

[0220] Los datos obtenidos de los análisis con cultivos celulares y estudios animales pueden usarse en formular un rango de dosificación para empleo en humanos. La dosificación de tales compuestos se sitúa preferiblemente dentro de un rango de concentraciones en circulación que incluyen la ED_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este rango dependiendo de la forma farmacéutica empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto utilizado en el método de la divulgación, la dosis terapéuticamente efectiva puede calcularse inicialmente de los análisis con cultivos celulares. Puede formularse una dosis en modelos animales para conseguir un rango de concentración plasmática en circulación que incluya la IC_{50} (es decir, la concentración del compuesto de prueba que alcanza una inhibición semi-máxima de los síntomas) como se determina en el cultivo celular. Tal información puede utilizarse para determinar con mayor precisión dosis útiles en humanos. Los niveles en el plasma pueden cuantificarse, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento.

[0221] Como se define en esta especificación, una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto activo (es decir, una dosis efectiva) puede variar en el rango de desde alrededor de 0.001 a 100 g/kg de peso corporal, u otros rangos que serían evidentes y se entenderían por los expertos, sin experimentación excesiva. El experto con habilidad en el arte observará que ciertos factores pueden influir en la dosificación y el momento oportuno requeridos para tratar efectivamente a un sujeto, incluyendo, pero no limitados a, la gravedad de la enfermedad o trastorno,

los tratamientos previos, la salud general o la edad del sujeto, y otras enfermedades presentes.

EJEMPLOS

[0222] Sin la intención de limitar el ámbito de la invención, los instrumentos, aparatos, métodos ejemplares y sus resultados relacionados, de acuerdo con las incorporaciones de la presente invención, se dan a continuación. Nótese que los títulos o subtítulos pueden usarse en los ejemplos para conveniencia de un lector, lo cual en ninguna manera debe limitar el ámbito de la invención. Más aún, ciertas teorías se proponen y divulgan en esta especificación; sin embargo, en modo alguno, sin importar si son correctas o incorrectas, deben limitar el ámbito de la invención, siempre y cuando la invención se ponga en práctica de acuerdo con la invención, sin considerar cualquier teoría particular o esquema de acción.

Ejemplo 1: Constructo génico para expresión de HA

[0223] La secuencia HA del H5N1 de la gripe fue la consenso H5, CHA5 (Chen MW, et al. (2008) Proc Natl Acad Sci USA 105:13538-13543). Los codones de CHA5 se optimizaron para expresión utilizando codones humanos. El sitio de escisión de la proteasa vírica original PQRERRRKKRG se mutó a PQRERG, con el fin de impedir que las proteínas de la escisión enzimática formaran HA1 y HA2. La región transmembrana (residuos: 533-555) se reemplazó con los residuos adicionales

(LVPRGSPGSGYIPEAPRDGOAYVRKDGEWVLLSTFLG**HHHHHH**)

en el C-término del constructo HA, donde el sitio de escisión está en cursiva, la secuencia de trimerización foldon de fibrina del bacteriófago T4 está subrayada, y el His-tag está en negrita (Stevens J. et al. (2006) Science 312:404-410). La secuencia de HA modificada se clonó en un vector pTT para expresión de la proteína (Durocher Y, et al. (2002) Nucleic

Acids Res 30:E9).

Ejemplo 2: Expresión y purificación de la proteína

[0224] El plásmido que codifica la HA secretada se transfectó en las líneas celulares de riñón embrionario humano de las células HEK293EBNA (número ATCC CRL-10852) o las células GnTI⁻ HEK293S (Reeves PJ, et al. (2002) Proc Natl Acad Sci USA 99:13419-13424) usando polietilenimina y se cultivó en medio de expresión Freestyle 293 (Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado con suero de ternero bovino al 0.5%. Se recogió el sobrenadante 72 h después de la transfección y se depuró mediante centrifugación. Las proteínas HA se purificaron con cromatografía de quelación con níquel, como se describe previamente (Wei CJ, et al. (2008) J Virol 82:6200-6208) para obtener HA_{fg} completamente glucosilada y HA_{hm} tipo alta manosa. Para obtener la proteína HA sin sialilación—la HA_{ds} desialilada—la proteína purificada se trató con 20 mM neuraminidasa *Clostridium* (NA; Sigma) durante 2 h a 37°C. Luego del tratamiento con NA, la proteína se purificó nuevamente para separarse de la NA. La HA_{hm} purificada se trató con Endo H (NEB) durante 2 h a 37°C para producir la proteína HA con una mono GlcNAc en los sitios de glucosilación, la HA_{mg} monoglucosilada. Todas la proteínas HA purificadas se analizaron con SDS PAGE, arreglo de glicanos y la espectrometría de masas (MS).

Ejemplo 3: Liberación de N-glicanos de glucoproteínas para análisis MS

[0225] Las glucoproteínas HA purificadas se redujeron con 10 mM ditioneitol (DTT, Sigma) a 37°C durante 1 hora. La muestra reducida se alquiló entonces mediante 50 mM yodoacetamida (IAA, Merck) en la oscuridad durante 1 hora y luego se eliminó la concentración de sal con agua doblemente destilada (ddH₂O) y se secó en un vacío de alta velocidad. Los extractos de proteína HA reducida y alquilada se digirieron

primeramente con tripsina (Roche) en una relación aproximada de enzima a proteína a 1:20 (p/p) en 50mM de solución amortiguadora de bicarbonato de amonio pH 8.3 a 37°C durante 4 horas, seguida por digestión con tripsina secundaria (Roche), y luego se cargaron en un cartucho de fase inversa C18 Sep-Pak cartridge (Waters Corp). Las muestras se incubaron posteriormente con N-glucosidasa F (Roche) en 50 mM bicarbonato de amonio pH 8.3 a 37°C durante 16 horas, y con dos incubaciones más con N-glucosidasa F. Se separaron los N-glicanos liberados de los péptidos/glicopéptidos por el procedimiento de cartucho C 18 Sep-Pak con N-glicanos recogidos en ácido acético al 5% (AcOH), la fracción de flujo. Los péptidos se eluyeron en 20%, 40% y 60% 1-propanol con 5% AcOH.

Ejemplo 4: análisis MALDI-MS y MS/MS

[0226] Todas las muestras de glicano se permetilaron usando el método de suspensión NaOH/sulfóxido de dimetilo. La suspensión NaOH/DMSO se mezcló con las muestras de glicano secas en un tubo de vidrio con tapa roscada, y se agregaron al tubo 300 µL de yodometano (Merck), y el tubo se sometió a vorticidad durante 25 min. La reacción se terminó agregando ~1 ml ddH₂O gota a gota, y luego se agregó un volumen igual de cloroformo. Los glicanos permetilados se extrajeron en la capa orgánica inferior y NaOH adicional, así como se eliminaron otros contaminantes hidrófilos por extracción repetida con ddH₂O. El cloroformo se evaporó mediante gas nitrógeno. Para la identificación de los glicanos, los glicanos permetilados en acetonitrilo se mezclaron 1:1 con 10 mg/ml de ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB - *2,5-dihydroxybenzoic acid*) en 50% de acetonitrilo, se esparcieron las manchas en una placa diana calentada, y se recrystalizaron en placa con acetonitrilo. La adquisición de datos se realizó en un Analizador ABI 4700Proteomics (Applied Biosystems), operado en el modo reflectron. Se acumularon disparos de láser (5 Hz; 10 disparos por espectro) hasta que se obtuvo una relación satisfactoria señal a ruido, cuando se combinaron y suavizaron. En el instrumento TOF/TOF, se

adquirieron manualmente datos CID MS/MS de alta energía e incluyeron típicamente un total de 40 sub-espectros de 125 disparos de láser en una configuración de energía láser de 5000-5500.

Ejemplo 5: Fabricación del arreglo de glicanos

[0227] Se prepararon químicamente 24 glicanos, que contenían ácido siálico, diseñados para HAs, y se utilizaron para la fabricación del arreglo. Se imprimieron los microarreglos (BioDot; Cartesian Technologies) mediante deposición con pin robótico (SMP3; TeleChem International) de ~0.7 nL de varias concentraciones de glicanos con contenido de amina en solución amortiguadora de impresión (300 mM amortiguador de fosfato, pH 8.5, que contenía 0.005% Tween 20) de una placa de 384 pocillos en placas de vidrio recubiertas con NHS (Nexterion H slide; SCHOTT Norteamérica). Las placas para los sialósidos se esparcieron en manchas con soluciones de glicanos 1-17 y 21-27, con concentraciones de 100 μ M en cada fila para un glicano de abajo hacia arriba, con 12 réplicas puestas horizontalmente en cada subarreglo, y cada placa se diseñó para 16 cuadrículas para experimentos posteriores de incubación. Las placas impresas se hicieron reaccionar en una atmósfera de 80% de humedad durante una hora, seguidas por desecación de un día para otro, y se almacenaron a temperatura ambiente en un desecador hasta el momento del uso. Antes del análisis de unión, estas placas se bloquearon con etanolamina (50 mM etanolamina en amortiguador de borato, pH 9.2) y se lavaron luego con agua y amortiguador PBS, pH 7.4, dos veces.

Ejemplo 6: Marcación de hemaglutinina con Cy3-éster NHS

[0228] Cada muestra de proteína HA se diluyó con PBS (pH=7.4) a la concentración final de 1 mg/mL, y luego se marcó con Cy3Mono éster NHS (5 μ L, 0.2 mg/ml) (GE Healthcare, Reino Unido). Una vez habían avanzado

las reacciones 18 horas sobre hielo, se agregaron 20 μL de 500 mM de glicina en PBS a cada tubo para extinguir las reacciones. A continuación se incubaron las soluciones en hielo durante 30 minutos más. Se extrajeron las moléculas de tinte no reactiva pasando cada solución a través de un filtro de espín de exclusión de tamaño (Microcon YM-30, Millipore, USA) con un corte de peso molecular de 30 kDa. Con el fin de obtener la relación de tinte/proteína, cada muestra de proteína marcada se diluyó con PBS para las mediciones de absorbencia dual a 280 nm (para proteína) y a 552 nm (para Cy3; el coeficiente de extinción molar es $150,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a esta longitud de onda) utilizando el espectrómetro NanoDrop ND-100 (NanoDrop Technologies, USA). Luego de corregir el cálculo para la absorbencia de CyDye a 280 nm (aproximadamente 8% de la absorbencia a 552 nm), se generaron las relaciones de colorante/proteína a partir de los resultados de las mediciones de absorbencia dual.

Ejemplo 7: Análisis de unión indirecta

[0229] Se prepararon variantes glucosiladas de HA en 0.005% Tween 20/amortiguador PBS, pH 7.4, y se agregaron para cubrir la cuadrícula en el arreglo de glicanos con aplicación de una cubierta de vidrio. Luego de la incubación en una cámara húmeda, agitando durante 1 h, las placas se lavaron tres veces con 0.005% Tween 20/amortiguador PBS, pH 7.4. A continuación, se agregó anticuerpo anti-H5N1 HA en conejo a las placas y se incubó en una cámara húmeda durante 1 h. Después de lavar tres veces las placas con 0.005% Tween 20/amortiguador PBS, se agregó anticuerpo IgG anti-conejo conjugado con Cy3 a las placas y se incubó en una cámara húmeda durante 1 h más. Las placas se lavaron tres veces con 0.05% Tween 20/amortiguador PBS, pH 7.4; tres veces con amortiguador PBS, pH 7.4; y tres veces con H_2O , y luego se secaron. Se escanearon las placas a 595 nm (para Cy3) con un lector de chips de fluorescencia de microarreglo (GenePix Pro 6.0; Molecular Devices).

Ejemplo 8: Análisis de unión directa

[0230] Proteínas HA marcadas con Cy3 con diferente glucosilación se prepararon en 0.005% Tween 20/amortiguador PBS (pH 7.4) y se agregaron para cubrir la cuadrícula en un arreglo de glicanos con aplicación de una cubierta de vidrio. Después de la incubación en una cámara húmeda con agitación durante 1 h, las placas se lavaron tres veces con 0.005% Tween 20/amortiguador PBS (pH 7.4), tres veces con amortiguador PBS (pH 7.4), y tres veces con H₂O y se secaron. La placa se escaneó a 595 nm (para Cy3) con un lector de chips de fluorescencia de microarreglo (GenePix Pro 6.0, Molecular Devices, USA).

Ejemplo 9: Análisis de microneutralización

[0231] El virus H5N1 (NIBRG-14) recién preparado (National Institute for Biological Standards and Control, Potters Bar, Reino Unido) se cuantificó con la dosis infecciosa mediana de cultivo tisular (TCID₅₀ - *median tissue culture infectious dose*). La TCID₅₀ con un factor de aumento 100 del virus se mezcló en un volumen igual con diluciones seriadas en un factor de 2 de solución patrón concentrada de suero en placas de 96 pocillos y se incubó durante 1 h a 37°C. La mezcla se agregó a células MDCK (1.5 x 10⁴ células por pocillo) en las placas, seguida por incubación a 37°C durante 16-20 h. Las células se lavaron con PBS, se fijaron en solución de acetona/metanol (vol/vol 1:1), y se bloquearon con leche descremada al 5%. Se detectó el antígeno vírico mediante ELISA indirecto con a mAb contra NP de la gripe A (Sui JH, et al. (2009) Nat Struct Mol Biol 16:265-273).

Ejemplo 10: Ratones, vacunación, y exposición

[0232] Ratones hembra BALB/c de 6 a 8 semanas de edad (n = 15) se inmunizaron intramuscularmente con 20 µg de proteínas HA_{fg} purificada o

HA_{mg} en 50 µL de PBS, pH 7.4, y se mezclaron con 50 µL de 1 mg/mL de hidróxido de aluminio (Alum; Sigma) en las semanas 0 y 2. Se recogió sangre 14 días después de la inmunización, y se tomaron muestras de suero de cada ratón. Los ratones inmunizados se expusieron intranasalmente con un virus H5N1 genéticamente modificado, NIBRG-14, con una dosis letal (dosis letal con un factor de aumento de 100 al 50% de los ratones). Los ratones se monitorearon diariamente durante 14 días luego de la exposición para determinar la supervivencia. Todos los experimentos animales se evaluaron y aprobaron por el Institutional Animal Care and Use Committee of Academia Sinica.

Ejemplo 11: Análisis de hemaglutinación (HA)

[0233] La hemaglutinación de glóbulos rojos de pollo (cRBCs - *chicken red blood cells*, Lampire Biological Laboratories, Pipersville, Pa.) se lleva a cabo en placas de microtitulación de 96 pocillos de base redonda preparando diluciones seriadas con un factor de 2 de muestras víricas en PBS, como se describe en Jones, et al., Journal of Virology, 80(24): 11960-11967 (2006). El título se reporta en unidades hemaglutinantes por 50 µL (HAU/50 µL) de muestra.

Ejemplo 12: Purificación de hemaglutinina vírica

[0234] Hemaglutinina (HA) asociada a virión se purificó de partículas del virus de la gripe, como se describe en Johansson, et al., Journal of Virology, 1989, Vol. 63(3), p. 1239-1246, con modificaciones. En síntesis, se recoge el virus del fluido alantoico de huevos de gallina infectados y se purifica en sacarosa como se describe anteriormente. Los sedimentos celulares se resuspenden en 0.5 mL de amortiguador de acetato de sodio (0.05 M acetato de sodio, 2 mM CaCl₂, 0.2 mM EDTA, pH a 7.0), se homogenizan a través de una aguja calibre 18, y se mezclan con un volumen igual de octilglucósido al 15% octil-β-d-tioglucoído; Fisher Scientific, Norcross,

Ga.) en amortiguador de acetato de sodio, seguido por vorticidad vigorosa durante 5 minutos. Esta suspensión se centrifuga a 18,400xg durante 60 minutos a 4°C, y se retira cuidadosamente el sobrenadante y se reserva como la fracción rica en HA. Se agrega bromuro de cetil trimetil amonio acuoso al dos por ciento (CTAB, Bio-World, Dublin, Ohio) a la fracción HA a una concentración final de 0.1% CTAB, y la muestra se aplica a una columna de intercambio iónico DEAE-Sephadex (A-50; GE Healthcare, Uppsala, Suecia) (lecho, 0.7 cm x 6.0 cm) esponjada previamente y equilibrada con 0.05 M Tris-clorhidrato (pH 7.5), que contenía octilglucósido al 0.1%. Se recogieron 20 fracciones de 0.5 mL por gravedad con amortiguador de elución de HA de bajo contenido salino (0.05 M TrisHCl, 0.1 M NaCl, 0.1% Triton X-100, pH a 7.5) y nuevamente con un amortiguador de elución de HA con alto contenido salino (0.05 M TrisHCl, 0.2 M NaCl, 0.1% Triton X-100, pH a 7.5). Se examinaron fracciones individuales para detectar actividad HA y se analizaron con respecto a su pureza mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS), bajo condiciones no reductoras, seguidas por tinción con Commassie coloidal. La concentración de proteína se determina por el análisis BCA según instrucciones del fabricante (Pierce, Rockford, III.).

Ejemplo 13: Análisis de datos del arreglo

[0235] Se utilizó el software GenePix Pro (Axon Instruments) para el análisis de fluorescencia de los datos extraídos. Se restó el fondo local de la señal en cada mancha. Las manchas con defectos obvios, señal no detectable, o una fluorescencia neta de <100 se eliminaron del análisis. Se promediaron las "medianas de las relaciones" de manchas replicadas en el mismo arreglo. La identificación de la unión de HA al arreglo (Fig. 2A) y la determinación de la constante de asociación (Fig. 2B) se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones en el mismo arreglo, para garantizar que los datos estuvieran normalizados.

[0236] Para determinar el valor $K_{D,surf}$, se analizaron los datos de equilibrio ajustando los datos a las isothermas de Langmuir (ecuación 1), asumiendo que ligandos adheridos a uno o dos sitios independientes, empleando el programa comercial de regresión no lineal GradPad PRISM (Graph-Pad).

[0237] F_{max} es la intensidad de fluorescencia máxima, una medida de la cantidad de carbohidrato activo en la superficie; (P) es la concentración total de proteínas HA, y $K_{D,surf}$ es la constante de disociación de equilibrio entre los carbohidratos de la superficie y las proteínas.

[0238] Los valores $K_{D,surf}$ de cada muestra se repitieron y calcularon por lo menos 4 veces para derivar la media de $K_{D,surf}$. Empleando los valores $K_{D,surf}$, pueden determinarse los parámetros termodinámicos de las ecuaciones (2) y (3).

$$F_{obs} = F_{max}(P)/(K_{D,surf} + (P)) \quad \{\text{Ecuación 1}\}$$

$$K_{D,surf} = K_{A,surf}^{-1} \quad \{\text{Ecuación 2}\}$$

$$\Delta G_{multi} = RT \ln(K_{A,surf}) \quad \{\text{Ecuación 3}\}$$

[0239] $K_{A,surf}$ representa las constantes de asociación en la ecuación (1). En la ecuación (2), $R = 1.987 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$; T es la temperatura absoluta, y los experimentos se realizaron a 298 K. Estos valores de cada muestra se calcularon usando Microsoft Excel. El análisis estadístico de $K_{D,surf}$ en diferentes glicoformas de HA se llevó a cabo con ANOVA de una sola vía empleando GraphPad PRISM (GraphPad).

Ejemplo14: Determinación de anticuerpos específicos de HA en suero mediante ELISA

[0240] Las proteínas HA se purificaron de HEK293 y se esparcieron en placas de 96 pocillos (5 $\mu\text{g/mL}$) de un día para otro. El suero de ratón se diluyó con un factor de 100 para ser el suero patrón concentrado para la

medición de la unión de HA. Las placas recubiertas con HA se incubaron con suero en diluciones seriales con un factor de 2 durante 1 h. Se detectó IgG específica de HA utilizando anticuerpos anti-ratón, conjugados con HRP. La dilución final se calculó escogiendo la dilución para la que la lectura estuvo por encima de la de la dilución 1:50 de suero preinmunitario (Stevens J. et al. (2006) Science 312:404-410). El antisuero de ratón se preparó por LTK BioLaboratories. El conejo se inmunizó con alrededor de 0.25-0.35 mg de proteínas HA, mezcladas con coadyuvantes completo o incompleto. Se recogió sangre del conejo después de seis inmunizaciones, con un programa de una inmunización cada 2 semanas.

Ejemplo 15: Análisis de sitios de glucosilación para HA

[0241] Un total de 297 secuencias de HA de longitud total del virus de la gripe H1, H3, y H5 se obtuvieron de la base de datos del National Center for Biotechnology Information y se alinearon mediante el programa ClustalW2 en EMBL-EBI (Larkin MA, et al. (2007) Bioinformatics 23:2947-2948). Las secuencias datan de los años 1918 a 2000 y se aislaron de humanos. Para reducir la redundancia, las cepas en un país se seleccionaron únicamente una vez para análisis. Las secuencias utilizadas para alineamiento incluyen: H1 (AAX56530, AAY78939, ABA18037, ABB51962, ABC42750, ABD60867, ABD62061, ABE11690, ABF47869, ABF82830, ABF82852, ABG37362, ABI19015, ABI21211, ABI95294, ABI96103, ABK39995, ABK57092, ABK57093, ABK79970, ABO32948, ABO32970, ABR15885, ABS71664, y ABS76427); H3 (AAT08000, AAT12654, AAX11455, AAY58320, AAZ32943, AAZ43394, ABA26700, ABA26777, ABB51961, ABB71825, ABC42596, ABC42607, ABC42629, ABC43017, ABD15713, ABD59850, ABD61359, ABF17954, ABG37450, y ABG37461); H5 (AAS65618, AAT39065, AAT73273, AAT73274, AAT73275, AAT84153, AAV32636, ABC72655, ABD28180, ABD28182, ABE97624, ABI16504, ABI36144, ABI36439, ABO10181, ABO36644, y ABP51968). Glucosilaciones N-enlazadas de secuencias de HA se

predijeron por el centro de servidores para predicción de análisis de secuencias biológicas (www.cbs.dtu.dk/services/). Para la glucosilación de asparagina (Asn), las secuencias contienen el patrón de aminoácidos Asn-X_{aa}-(Ser/Thr), donde X_{aa} puede ser cualquier aminoácido excepto prolina (Gavel Y, et al. (1990) *Protein Eng* 3:433-442), seguida por serina o treonina. Los resultados para el análisis de datos se prepararon empleando el programa PRISM (GraphPad) y Jalview (Waterhouse AM, et al. (2009) *Bioinformatics* 25:1189-1191).

Ejemplo 16: Método químico para la síntesis de glicopéptidos HA

[0242] La síntesis gradual de glicopéptidos puede llevarse a cabo por el método del anhídrido mixto dimetilfosfotioico (Mpt-MA) (Inazu, T., et al. (1997) en *Peptide Chemistry 1996* (Kitada, C. ed.) pp.41-44, Protein Research Foundation, Osaka). Las glucoproteínas HA pueden sintetizarse mediante un método tioéster con una secuencia de consenso "Asn-X-Ser/Thr" para N-glucosilación, pero sin cadenas de azúcar. El fragmento peptídico se prepara mediante un sintetizador automático empleando un programa Boc-strategy. La reacción de acoplamiento se lleva a cabo utilizando DCC/HOBt como el reactivo activador. El residuo Asn(GlcNAc) se acopla por un método Mpt-MA usando Boc-Asn(GlcNAc)-OH (3 equiv). Las reacciones de acoplamiento se realizan durante 1h y se repiten con monitoreo. Luego del tratamiento con HF anhidro, que contenía 10% anisol y purificación por HPLC, se obtiene un tioéster de glicopéptido. Este segmento tioéster de glicopéptido se acopla con el otro segmento del péptido, el cual se preparó separadamente por el método de condensación del segmento tioéster. Luego de las desprotecciones y formación del enlace disulfuro, se obtiene el análogo GlcNAc-HA.

[0243] Alternativamente, una síntesis de método convergente de glicopéptidos HA puede llevarse a cabo mediante la reacción de acoplamiento del grupo β -carboxilo de peptidilo Asn con glucosilamina.

(Véase Cohen-Abisfeld, S.T., and Lansbury, P.T. (1993) J. Am. Chem. Soc. 115, 10531-10537).

Ejemplo 17: Método químio-enzimático para síntesis de glicopéptidos HA

[0244] La preparación de un glicopéptido que contiene un oligosacárido complejo puede realizarse empleando métodos enzimáticos junto con métodos químicos. La síntesis de N-glicopéptidos puede efectuarse usando la actividad de transglucosilación de endo- β -N-acetilglucosaminidasa (endo- β -GlcNAc-asa). (Takegawa, K., et al. (1995) J. Biol. Chem. 270, 3094-3099). La endo- β -GlcNAc-asa hidroliza el enlace glicosídico entre la fracción N,N'-diacetilquitobiosa de un oligosacárido N-enlazado, y transfiere el fragmento oligosacárido liberado a un compuesto hidroxilo. La síntesis de N-glicopéptidos empleando endo- β -GlcNAc-asa puede realizarse en dos pasos. Primero, se prepara un péptido que contiene a GlcN Ac por una ruta química. Luego un fragmento oligosacárido de un donador glucosilo se transfiere a la fracción GlcNAc del glicopéptido como un aceptor glucosilo mediante la reacción de transglucosilación de la endo- β -GlcNAc-asa.

[0245] Aunque incorporaciones específicas de la invención se han descrito en esta especificación para efectos de ilustración, pueden introducirse varias modificaciones, sin desviarse del espíritu y el ámbito de la invención. Por consiguiente, la invención no se limita, excepto en lo que concierne a las reivindicaciones adjuntas.

[0246] Aunque la invención se ha descrito en conjunto con la descripción detallada de la misma, la anterior descripción tiene como fin ilustrar y no limitar el ámbito de la invención, la cual se define por el ámbito de las reivindicaciones anexas. Otros aspectos, ventajas, y modificaciones están dentro del ámbito de las siguientes reivindicaciones.

[0247] Las patentes y literatura científica mencionadas en esta especificación establecen el conocimiento que está disponible a los expertos en el arte. Todas las patentes de los Estados Unidos y solicitudes de patente de los Estados Unidos, publicadas o no publicadas, citadas en esta especificación, se incorporan por referencia. Todas las patentes extranjeras publicadas y solicitudes de patente, citadas en esta especificación, se incorporan por el presente medio por referencia. Solicitudes al Genbank y NCBI, indicadas por el número de acceso, citadas en esta especificación, se incorporan por el presente medio por referencia. Todas las demás referencias publicadas, documentos, manuscritos y literatura científica, citados en esta especificación, se incorporan por el presente por referencia.

[0248] Aunque esta invención se ha ilustrado y descrito particularmente con referencias a incorporaciones preferidas de la misma, se entenderá por los expertos en el arte que pueden introducirse varios cambios en forma y detalles, sin apartarse del ámbito de la invención, abarcado por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunógena para suscitar una respuesta inmunitaria a un patógeno de origen vírico, bacteriano, fúngico u otro origen, comprendiendo la composición:

una glucoproteína antígeno del patógeno de origen vírico, bacteriano, fúngico u otro origen, en donde la glucoproteína incluye por lo menos un sitio de glucosilación y en donde la glucoproteína antígeno se glucosila parcialmente en uno o más sitios de glucosilación.

2. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el patógeno es un virus y, además, en donde antígeno parcialmente glucosilado es un virus, un péptido vírico, una proteína, un polipéptido, o un fragmento de los anteriores, derivado de un virus.

3. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 2, en la cual el virus se selecciona del virus de la gripe, virus respiratorio sincitial (VRS), clamidia, adenoviridae, mastadenovirus, aviadenovirus, herpesviridae, virus del herpes simple 1, virus del herpes simple 2, virus del herpes simple 5, virus del herpes simple 6, leviviridae, levivirus, enterobacterias fase MS2, allosevirus, poxviridae, chordopoxvirinae, parapoxvirus, avipoxvirus, capripoxvirus, leporipoxvirus, suipoxvirus, molluscipoxvirus, entomopoxvirinae, papovaviridae, polyomavirus, papillomavirus, paramyxoviridae, paramyxovirus, virus paragripal 1, morbillivirus, virus del sarampión, rubulavirus, virus de la parotiditis, pneumonovirinae, pneumovirus, metapneumovirus, pneumovirus aviar, metapneumovirus humano, picornaviridae, enterovirus, rinovirus, hepatovirus, virus de la hepatitis A humana, cardiovirus, andapthovirus, reoviridae, orthoreovirus, orbivirus, rotavirus, cypovirus, fijivirus, phytoreovirus, oryzavirus, retroviridae, retrovirus tipo B mamíferos, retrovirus tipo C mamíferos, retrovirus tipo C aviares, grupo de retrovirus tipo D, retrovirus BLV-HTLV, lentivirus, virus de la inmunodeficiencia

humana 1, virus de la inmunodeficiencia humana 2, espumavirus, flaviviridae, virus de la hepatitis C, flavivirus, virus del dengue, hepadnaviridae, virus de la hepatitis B, togaviridae, alphavirus sindbis virus, rubivirus, virus de la rubéola, rhabdoviridae, vesiculovirus, virus de la fiebre de Lassa, ephemerovirus, cytorhabdovirus, necleorhabdovirus, arenaviridae, arenavirus, virus de la coriomeningitis linfocítica, virus Ippy, lassa virus, coronaviridae, coronavirus y torovirus.

4. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 3, en la cual el péptido vírico, proteína, polipéptido, o un fragmento de los anteriores es una glucoproteína de superficie, seleccionada de la neuraminidasa del virus de la gripe, hemaglutinina del virus de la gripe, la proteína M2 del virus de la gripe, las proteínas víricas del virus respiratorio sincitial (VRS), glucoproteína F VRS, glucoproteína G VRS, proteínas víricas de virus del herpes simple (VHS), glucoproteínas del virus del herpes simple gB, gC, gD, y gE, antígenos MOMP y PorB de clamidia, nucleoproteína, proteína de matriz u otra proteína del virus del dengue, hemaglutinina del virus del sarampión, glucoproteína gB del virus herpes simplex tipo 2, poliovirus I VP1, glucoproteínas de la envoltura de VIH 1, antígeno de superficie de la hepatitis B, toxina de la difteria, epítipo del estreptococo 24M, pilina gonocócica, g50 (gpD) del virus de la pseudorrabia, (gpB) del virus de la pseudorrabia II, (gpC) del virus de la pseudorrabia III, glucoproteína H del virus de la pseudorrabia, glucoproteína E del virus de la pseudorrabia, glucoproteína 195 de la gastroenteritis transmisible, proteína de la matriz de la gastroenteritis transmisible, glucoproteína 38 del rotavirus del cerdo, proteína de la cápside del parvovirus del cerdo, antígeno protector de la *Serpulina hydodysenteriae*, glucoproteína 55 de la diarrea vírica bovina, hemaglutinina-neuraminidasa del virus de la enfermedad de Newcastle, hemaglutinina del virus de la gripe porcina, neuraminidasa de la gripe porcina, virus de la aftosa, virus del cólera porcino, virus de la gripe porcina, virus de la fiebre porcina africana, *Mycoplasma liyopneutiioniae*,

virus de la rinotraqueítis bovina infecciosa, glucoproteína E del virus de la rinotraqueítis bovina infecciosa, glucoproteína G, virus de la laringotraqueítis infecciosa, glucoproteína G o glucoproteína I del virus de la laringotraqueítis infecciosa, una glucoproteína del virus de La Crosse, virus de la diarrea de ternero neonatal, virus de la encefalomiелitis equina venezolana, Punta Toro virus, virus de la leucemia murina, virus del tumor mamario de ratón, nucleoproteína del virus de la hepatitis B y antígeno de superficie del virus de la hepatitis B o un fragmento o derivado de los anteriores, antígeno del virus de la gripe equina o virus del herpes equino, incluyendo el virus de la gripe equina tipo A/neuraminidasa Alaska 91, virus de la gripe equina tipo A/neuraminidasa Miami 63, virus de la gripe equina tipo A/neuraminidasa Kentucky 81, glucoproteína B del virus del herpes equino tipo 1, y glucoproteína D del virus del herpes equino tipo 1, antígeno del virus respiratorio sincitial bovino o virus paragripal bovino, proteína de adhesión del virus respiratorio sincitial (BRSV G), proteína de fusión del virus respiratorio sincitial bovino (BRSV F), proteína de la nucleocápside del virus respiratorio sincitial bovino (BRSVN), proteína de fusión del virus paragripal bovino tipo 3, hemaglutinina neuraminidasa del virus paragripal bovino tipo 3, glucoproteína 48 del virus de la diarrea vírica bovina y glucoproteína 53, glucoproteína E del virus del dengue y glucoproteína E1 o E2 del virus de la hepatitis C humana.

5. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la glucoproteína parcialmente glucosilada del patógeno se genera por desglucosilación parcial, empleando uno o más de métodos químicos o enzimáticos.

6. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el antígeno vírico parcialmente glucosilado se glucosila parcialmente en un sitio de O-glucosilación o N-glucosilación.

7. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 1, en

donde el antígeno vírico parcialmente glucosilado comprende un sitio de N-glucosilación que incluye una secuencia de aminoácidos de asparagina- X_{aa} -serina y asparagina- X_{aa} -treonina, donde X_{aa} es cualquier aminoácido excepto prolina.

8. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el antígeno vírico parcialmente glucosilado es hemaglutinina (HA) mono-, di-, o tri-glucosilada del virus de la gripe, neuraminidasa (NA) o proteína M2, o fragmentos inmunogénicos de las anteriores.

9. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el antígeno vírico parcialmente glucosilado es una hemaglutinina del virus de la gripe, glucosilada con N-acetilglucosamina (GlcNAc) y/o manosa.

10. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el antígeno vírico parcialmente glucosilado es una hemaglutinina mono-glucosilada, seleccionada del grupo conformado por H1, H3, y H5 parcialmente glucosilada del virus de la gripe.

11. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el antígeno vírico parcialmente glucosilado es una hemaglutinina mono-glucosilada del virus de la gripe, glucosilada con N-acetilglucosamina (GlcNAc).

12. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la hemaglutinina mono-glucosilada del virus de la gripe comprende un sitio de N-glucosilación que incluye la región Sa.

13. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la hemaglutinina mono-glucosilada del virus de la gripe comprende una glucosilación parcial en el residuo de asparagina en la posición 177.

14. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 11, en

donde la hemaglutinina mono GlcNAc-glucosilada del virus de la gripe despliega una especificidad reducida y una afinidad mejorada por la unión HA-receptor.

15. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 14, en donde la hemaglutinina mono GlcNAc-glucosilada del virus de la gripe une un HA-receptor sialilado.

16. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la hemaglutinina mono-glucosilada del virus de la gripe comprende un polipéptido que incluye una secuencia HA H5 de consenso (SEQ ID NO: 4).

17. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 16, en donde la secuencia de consenso de HA H5 mono-glucosilada (SEQ ID NO: 4) se glucosila en residuos asparagina en una o más de las posiciones 39, 127, 170, 181, 302, 495 y 500.

18. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la hemaglutinina mono-glucosilada del virus de la gripe comprende una secuencia polipeptídica H1 seleccionada del grupo conformado por una secuencia del NIBRG-121 estacional (cepa de la vacuna A(H1N1) pandémica 2009) (SEQ ID NO: 6), una secuencia de consenso de H1-A (SEQ ID NO: 8) y una secuencia de consenso de H1-C (SEQ ID NO: 10).

19. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la secuencia de la hemaglutinina mono-glucosilada (HA) del virus de la gripe se selecciona del grupo conformado por una secuencia de consenso de HA H5 (SEQ ID NO: 4), una secuencia del NIBRG-121 (vacuna A(H1N1) pandémica 2009) (SEQ ID NO: 6), una secuencia de consenso de H1-A (SEQ ID NO: 8) y una secuencia de consenso H1-C (SEQ ID NO: 10), en donde la secuencia de HA se modifica para permitir la expresión en una célula eucariota apropiada.

20. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la hemaglutinina mono-glucosilada del virus de la gripe comprende un polipéptido de H1 estacional (Brisbane).
21. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el virus es virus respiratorio sincitial (VRS), y el antígeno vírico parcialmente glucosilado es una glucoproteína F (fusión) VRS mono-, di-, o tri- glucosilada, G (adhesión) o SH (hidrófoba pequeña), o fragmentos inmunogénicos de las anteriores.
22. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 21, en donde la secuencia de la proteína G VRS (SEQ ID NO: 12) se glucosila parcialmente en los residuos asparagina en uno o más sitios potenciales de N-glucosilación indicados en la Tabla 6.
23. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el virus es un flavivirus, y el antígeno vírico parcialmente glucosilado es una glucoproteína M de la envoltura mono-, di-, o tri-glucosilada del virus del dengue, glucoproteína E, o fragmentos inmunogénicos de las anteriores.
24. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 23, en donde la glucoproteína E de la envoltura mono-glucosilada del virus del dengue (SEQ ID NO: 13) se glucosila parcialmente en los residuos asparagina en uno o más sitios de N-glucosilación N67 y N153 indicados en Tabla 7.
25. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el virus es un virus de la hepatitis C, y el antígeno vírico parcialmente glucosilado es una glucoproteína E1 de la envoltura mono-, di-, o tri-glucosilada del virus de la hepatitis C, glucoproteína E2, o fragmentos inmunogénicos de las anteriores.

26. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 25 en donde glucoproteína E1 de la envoltura mono-glucosilada del virus de la hepatitis C (SEQ ID NO: 14) se glucosila parcialmente en los residuos de asparagina en uno o más sitios de N-glucosilación N196, N209, N234, N305, y N325 indicados en Tabla 8.

27. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el virus es un virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), y el antígeno vírico parcialmente glucosilado es una glucoproteína gp120 de la envoltura mono-, di-, o tri- glucosilada del VIH, glucoproteína gp41 transmembrana, o fragmentos inmunogénicos de las anteriores.

28. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 27 en donde glucoproteína gp120 de la envoltura mono-glucosilada del VIH (SEQ ID NO: 15) se glucosila parcialmente en los residuos asparagina en uno o más sitios potenciales de N-glucosilación indicados en Tabla 9.

29. Una vacuna que incluye:

(a) un polipéptido inmunógeno que comprende un glucoproteína de superficie vírica, o fragmentos inmunológicamente activos de la misma, parcialmente glucosilada a un estado de mono-, di-, o tri-glucosilación en uno o más sitios de glucosilación; y

(b) opcionalmente, un coadyuvante, en donde la vacuna es capaz de provocar una respuesta inmunitaria contra un virus.

30. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 29, en donde el virus es un virus de la gripe y la glucoproteína vírica es hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA) o M2.

31. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 30, en donde el virus de la gripe se selecciona del grupo conformado por un virus de la gripe aviar, un virus de la gripe animal y un virus de la gripe humana.

32. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 31, en donde el virus de la gripe aviar es H5N1.
33. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 31, en donde el virus de la gripe es el virus de la gripe A.
34. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 30, en donde luego de la introducción del polipéptido HA mono-glucosilado de la gripe en un sujeto, el polipéptido induce al sujeto a producir anticuerpos que se unen a un virus respiratorio.
35. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 34, en donde el virus respiratorio es un virus de la gripe aviar, animal y/o humana, o VRS.
36. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 34, en donde el antígeno vírico parcialmente glucosilado se glucosila parcialmente en un sitio de O-glucosilación o N-glucosilación.
37. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 34, en donde el antígeno vírico parcialmente glucosilado es un polipéptido HA mono-glucosilado del virus de la gripe, que comprende un sitio de N-glucosilación parcialmente glucosilada que tiene la secuencia de aminoácidos de asparagina- X_{aa} -serina y asparagina- X_{aa} -treonina, donde X_{aa} es cualquier aminoácido excepto prolina.
38. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 34, en donde el sitio de N-glucosilación comprende un polipéptido HA del virus de la gripe mono GlcNAc glucosilado y despliega especificidad reducida y afinidad mejorada por unión HA-receptor.
39. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 34, en donde el polipéptido HA del virus de la gripe mono-glucosilada comprende un sitio de N-glucosilación que incluye la región Sa.

40. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 34, en donde el polipéptido HA del virus de la gripe mono-glucosilada comprende un sitio de N-glucosilación en un residuo asparagina en la posición 177.
41. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 38, en donde la hemaglutinina del virus de la gripe mono GlcNAc-glucosilada une un HA-receptor sialilado.
42. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 34, en donde la hemaglutinina mono-glucosilada del virus de la gripe comprende un polipéptido que incluye una secuencia HA H5 de consenso (SEQ ID NO: 4).
43. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 42, en donde la secuencia HA H5 mono-glucosilada de consenso (SEQ ID NO: 4) se glucosila en residuos asparagina en una o más de las posiciones 39, 170, 181, 302 y 495.
44. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 34, en donde la hemaglutinina mono-glucosilada del virus de la gripe comprende una secuencia polipeptídica H1 seleccionada del grupo conformado por una secuencia del NIBRG-121 (cepa de la vacuna A(H1N1) pandémica 2009) (SEQ ID NO: 6), una secuencia H1-A de consenso (SEQ ID NO: 8) y una secuencia H1-C de consenso (SEQ ID NO: 10).
45. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 34, en donde la hemaglutinina mono-glucosilada del virus de la gripe comprende un polipéptido HA H1 estacional (Brisbane) y, además, en donde luego de la introducción de el polipéptido HA mono-glucosilada en un sujeto, el polipéptido HA H1 (Brisbane) induce al sujeto a producir anticuerpos que neutralizan el virus de la gripe NIBRG-121 (cepa de la vacuna A(H1N1) pandémica 2009), WSN (H1N1) 1933, o una cepa A/Puerto Rico/8/34 (H1N1):PR8.
46. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 34, en donde la

hemaglutinina mono-glucosilada del virus de la gripe comprende un polipéptido NIBRG-121 (cepa de la vacuna A(H1N1) pandémica 2009) y, además, en donde luego de la introducción del polipéptido HA mono-glucosilada en un sujeto, el polipéptido NIBRG-121 (cepa de la vacuna A(H1N1) pandémica 2009) induce al sujeto a producir anticuerpos que neutralizan la HA del virus de la gripe cepa H1 estacional (Brisbane), WSN (H1N1) 1933, o A/Puerto Rico/8/34 (H1N1):PR8.

47. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 34, en donde el sujeto es un mamífero, un ave, un animal, un cerdo, un caballo, o un humano.

48. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 34, en donde la vacuna despliega actividad antivírica significativa contra una o más cepas del virus de la gripe.

49. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 29, en donde el virus es el virus respiratorio sincitial (VRS), y el antígeno vírico parcialmente glucosilado es una glucoproteína F (fusión) VRS mono-, di-, o tri-glucosilada, G (adhesión) o SH (hidrófoba pequeña), o fragmentos inmunogénicos de las anteriores.

50. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 49, en donde la secuencia de la proteína G VRS mono-glucosilada (SEQ ID NO: 12) se desglucosila parcialmente en los residuos asparagina en uno o más sitios potenciales de N-glucosilación indicados en Tabla 6.

51. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 29, en donde el virus es un flavivirus, y el antígeno vírico parcialmente glucosilado es una glucoproteína M de envoltura del virus del dengue mono-, di-, o tri-glucosilada, glucoproteína E, o fragmentos inmunogénicos de las anteriores.

52. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 51, en la glucoproteína E (SEQ ID NO: 13) de envoltura del virus del dengue mono-glucosilada se desglucosila parcialmente en residuos asparagina en uno o más sitios de N-

glucosilación N67 y N153 indicados en Tabla 7.

53. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 29, en donde el virus es un virus de la hepatitis C, y el antígeno vírico parcialmente glucosilado es una glucoproteína E1 de envoltura del virus de la hepatitis C mono-, di-, o tri-glucosilada, glucoproteína E2, o fragmentos inmunogénicos de las anteriores.

54. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 53, en donde la glucoproteína E1 (SEQ ID NO: 14) de envoltura del virus de la hepatitis C mono-glucosilada se desglucosila parcialmente en residuos asparagina en uno o más sitios de N-glucosilación N196, N209, N234, N305, y N325 indicados en Tabla 8.

55. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 29, en donde el virus es un virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), y el antígeno vírico parcialmente glucosilado es una glucoproteína gp120 de envoltura del VIH mono-, di-, o tri-glucosilada, glucoproteína gp41 transmembrana, o fragmentos inmunogénicos de las anteriores.

56. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 55 en donde la glucoproteína gp120 (SEQ ID NO: 15) de envoltura del VIH mono-glucosilada se desglucosila parcialmente en residuos asparagina en uno o más sitios potenciales de N-glucosilación indicados en Tabla 9.

57. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 29, en donde el coadyuvante se selecciona de hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, los dos hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, coadyuvante incompleto de Freund (IFA), escualeno, alumbre, y MF59.

58. Un método para inmunizar un mamífero contra una infección viral, método que comprende:

administrar al mamífero susceptible a infección por el virus respiratorio una vacuna que contiene un polipéptido inmunógeno que

incluye una glucoproteína vírica, o un fragmento inmunológicamente activo de la misma, parcialmente glucosilada a un estado de mono-, di-, o tri-glucosilación, en donde la vacuna es capaz de provocar una respuesta inmunitaria contra el virus.

59. El método de acuerdo con la reivindicación 58, en donde la vacuna se administra mediante administración parenteral.

60. El método de acuerdo con la reivindicación 58, en donde la vacuna se administra intranasalmente.

61. El método de acuerdo con la reivindicación 58, en donde la vacuna se administra por inhalación.

62. El método de acuerdo con la reivindicación 58, en donde la vacuna se administra profilácticamente.

63. El método de acuerdo con la reivindicación 58, en donde la vacuna provoca una respuesta inmunitaria contra un virus o una cepa diferente del mismo virus, que es diferente del virus del cual se selecciona la glucoproteína vírica parcialmente glucosilada.

64. El método de acuerdo con la reivindicación 58, en donde el virus es un virus de la gripe y la glucoproteína vírica es hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA) o glucoproteína M2 del virus de la gripe.

65. El método de acuerdo con la reivindicación 64, en donde la glucoproteína vírica parcialmente glucosilada es una hemaglutinina (HA) de la gripe mono-glucosilada, que comprende un polipéptido que incluye una secuencia de consenso HA H5 (SEQ ID NO: 4).

66. El método de acuerdo con la reivindicación 64, en donde la glucoproteína vírica parcialmente glucosilada es una hemaglutinina (HA) de la gripe mono-glucosilada, que comprende una secuencia polipeptídica H1

seleccionada del grupo conformado por una secuencia (SEQ ID NO: 6) de NIBRG-121 (cepa de la vacuna A(H1N1) pandémica 2009), una secuencia de consenso (SEQ ID NO: 8) de H1-A y una secuencia de consenso (SEQ ID NO: 10) de H1-C.

67. El método de acuerdo con la reivindicación 64, en donde la vacuna provoca una respuesta inmunitaria contra cepas del virus de la gripe, que son diferentes de la cepa del virus de la gripe de la cual se selecciona la glucoproteína vírica parcialmente glucosilada.

68. El método de acuerdo con la reivindicación 67, en donde la glucoproteína vírica parcialmente glucosilada es una hemaglutinina (HA) de la gripe mono-glucosilada.

69. El método de acuerdo con la reivindicación 67, en donde la glucoproteína vírica parcialmente glucosilada es una neuraminidasa (NA) o proteína M2 de la gripe mono-glucosilada.

70. El método de acuerdo con la reivindicación 58, en donde el virus es el virus respiratorio sincitial (VRS), el antígeno vírico parcialmente glucosilado es una glucoproteína F (fusión) VRS mono-, di-, o tri-glucosilada, G (adhesión) o SH (hidrófoba pequeña), o fragmentos inmunogénicos de las anteriores.

71. El método de acuerdo con la reivindicación 70, en donde la secuencia de la proteína G VRS mono-glucosilada (SEQ ID NO: 12) se desglucosila parcialmente en los residuos asparagina en uno o más sitios potenciales de N-glucosilación indicados en Tabla 6.

72. El método de acuerdo con la reivindicación 58, en donde el virus es un flavivirus, y el antígeno vírico parcialmente glucosilado es una glucoproteína M de envoltura del virus del dengue mono-, di-, o tri-glucosilada, glucoproteína E, o fragmentos inmunogénicos de las anteriores.

73. El método de acuerdo con la reivindicación 72, en donde la glucoproteína E de envoltura del virus del dengue mono-glucosilada (SEQ ID NO: 13) se desglucosila parcialmente en los residuos asparagina en uno o más sitios de N-glucosilación N67 y N153 indicados en Tabla 7.

74. El método de acuerdo con la reivindicación 58, en donde el virus es un virus de la hepatitis C, y el antígeno vírico parcialmente glucosilado es una glucoproteína E1 de envoltura del virus de la hepatitis C mono-, di-, o tri-glucosilada, glucoproteína E2, o fragmentos inmunogénicos de las anteriores.

75. El método de acuerdo con la reivindicación 74 en donde la glucoproteína E1 de la envoltura del virus de la hepatitis C mono-glucosilada (SEQ ID NO: 14) se desglucosila parcialmente en los residuos asparagina en uno o más sitios de N-glucosilación N196, N209, N234, N305, y N325 indicados en Tabla 8.

76. El método de acuerdo con la reivindicación 58, en donde el virus es un virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), y el antígeno vírico parcialmente glucosilado es una glucoproteína gp120 de envoltura del VIH mono-, di-, o tri-glucosilada, glucoproteína gp41 transmembrana, o fragmentos inmunogénicos de las anteriores.

77. El método de acuerdo con la reivindicación 76, en donde la glucoproteína gp120 de envoltura del VIH mono-glucosilada (SEQ ID NO: 15) se desglucosila parcialmente en los residuos asparagina en uno o más sitios potenciales de N-glucosilación indicados en Tabla 9.

78. Un método de fabricación que incluye:

proveer una glucoproteína de superficie vírica glucosilada, o un fragmento inmulógicamente activo de la misma; y

eliminar por lo menos una porción de los glicanos ligados a uno o más sitios de glucosilación en la proteína para formar una proteína

parcialmente glucosilada, en donde por lo menos un glicano permanece ligado al sitio parcialmente glucosilado en la proteína y en donde la proteína conserva una conformación inmunológicamente activa.

79. El método de la reivindicación 78, que comprende además:

proveer una célula anfitriona eucariota que incluye un constructo apropiado para expresar un polipéptido recombinante, o un fragmento inmunológicamente activo del mismo, que contiene la secuencia de aminoácidos de una glucoproteína vírica; y

aislar el polipéptido de la glucoproteína vírica recombinante glucosilada del anfitrión eucariota.

80. El método de la reivindicación 78, en donde la proteína parcialmente glucosilada conserva la conformación terciaria de la glucoproteína vírica en su estado natural.

81. El método de la reivindicación 78, en donde la porción de los glicanos se elimina utilizando una glucosidasa, una neuraminidasa, una α -1-manosidasa, una endo F-N glicanasa, o una enzima que digiera selectivamente los carbohidratos en un sitio de glucosilación N- o O-enlazado.

82. El método de la reivindicación 78, en donde la porción de los glicanos se elimina utilizando un método químico que digiere selectivamente los carbohidratos en un sitio de glucosilación N- o O-enlazado.

83. El método de la reivindicación 79, en donde el anfitrión eucariota se selecciona de levadura, célula de insecto, baculovirus, célula mamífera, y una célula humana.

84. El método de la reivindicación 83, en donde la célula eucariota es una célula HEK293E.

85. El método de la reivindicación 78, en donde el sitio de glucosilación parcial conserva uno, o dos, o tres glicanos.

86. El método de la reivindicación 78, en donde la glucoproteína de superficie vírica se selecciona del grupo conformado por:

el péptido vírico, proteína, polipéptido, o un fragmento de los anteriores, que es una glucoproteína de superficie seleccionada de neuraminidasa del virus de la gripe, hemaglutinina del virus de la gripe, proteína M2 del virus de la gripe, proteínas víricas del virus respiratorio sincitial (VRS) humano, glucoproteína F VRS, glucoproteína G VRS, proteínas víricas del virus del herpes simple (VHS), glucoproteínas gB, gC, gD, y gE virus del herpes simple, antígenos MOMP y PorB de clamidia, nucleoproteína, proteína de matriz u otra proteína del virus del dengue, hemaglutinina del virus del sarampión, glucoproteína gB del virus del herpes simple tipo 2, VP1 del virus de la polio I, glucoproteínas de la envoltura de VIH 1, antígeno de superficie de la hepatitis B, toxina de la difteria, epítipo 24M del estreptococo, pilina gonocócica, virus de la pseudorrabia g50 (gpD), (gpB) del virus de la pseudorrabia, (gpC) del virus de la pseudorrabia III, glucoproteína H del virus de la pseudorrabia, glucoproteína E del virus de la pseudorrabia, glucoproteína 195 de la gastroenteritis transmisible, proteína de matriz de la gastroenteritis transmisible, glucoproteína 38 del rotavirus del cerdo, proteína del cápside del parvovirus del cerdo, antígeno protector *Serpulina hydodysenteriae*, glucoproteína 55 de la diarrea vírica bovina, hemaglutinina-neuraminidasa del virus de la enfermedad de Newcastle, hemaglutinina de la gripe porcina, neuraminidasa de la gripe porcina, virus de la aftosa, virus del cólera porcino, virus de la gripe porcina, virus de la fiebre porcina africana, *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides*, virus de la rinotraqueítis bovina infecciosa, glucoproteína E, glucoproteína G del virus de la rinotraqueítis bovina infecciosa, virus de la laringotraqueítis infecciosa, glucoproteína G o glucoproteína I del virus de la laringotraqueítis infecciosa, una

glucoproteína del virus de La Crosse, virus de la diarrea del ternero neonatal, virus de la encefalomiелitis equina venezolana, Punta Toro virus, virus de la leucemia murina, virus del tumor mamario de ratón, nucleoproteína del virus de la hepatitis B y antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, o un fragmento o derivado de las anteriores, antígeno del virus de la gripe equina o virus del herpes equino, incluyendo el virus de la gripe equina tipo A/neuraminidasa Alaska 91, virus de la gripe equina tipo A/neuraminidasa Miami 63, virus de la gripe equina tipo A/neuraminidasa Kentucky 81, glucoproteína B del virus del herpes equino tipo 1, y glucoproteína D del virus del herpes equino tipo 1, antígeno del virus respiratorio sincitial bovino o del virus paragripal bobino, proteína de adhesión del virus respiratorio sincitial bovino (BRSV G), proteína de fusión del virus respiratorio sincitial bovino (BRSV F), proteína de la nucleocápside del virus respiratorio sincitial bovino (BRSVN), proteína de fusión del virus paragripal bobino tipo 3, hemaglutinina/neuraminidasa del virus paragripal bobino tipo 3, glucoproteína 48 y glucoproteína 53 del virus de la diarrea vírica bovina, glucoproteína E del virus del dengue y glucoproteína E1 o E2 del virus de la hepatitis C humana.

Fig. 1

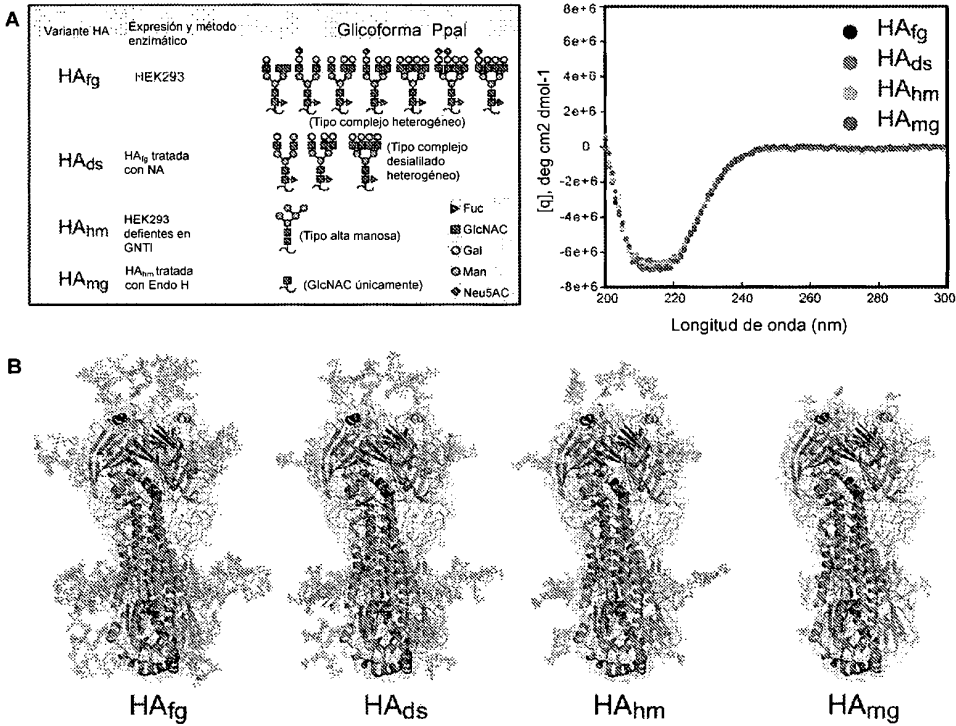
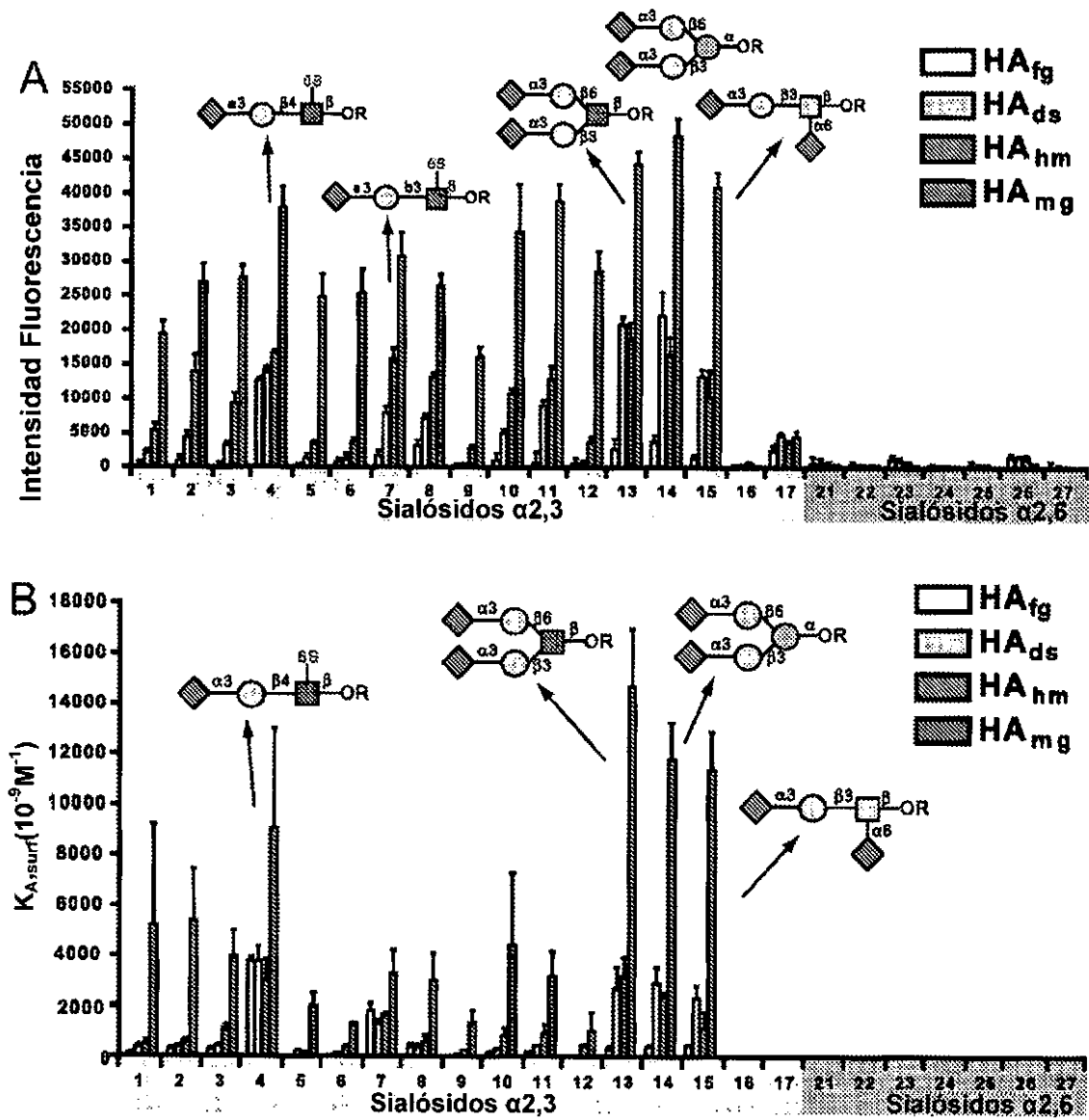


Fig. 2



Brisbane_H1	1		NRVKLELVGCTATATYD		TLGIGTHAMNNTDITDTYLENHTYTFHSNNEINSHNGKGLTGLTAPQI		QFVAGVILGIMRCELE		LSREWSITTEARRENT	109																																																																																														
California_H1	1		NRPAILVYVTEATANN		ELGIVHNNSTDTDTYLENHTYTFHSNNEINSHNGKGLTGLTAPQI		QFVAGVILGIMRCELE		LSREWSITTEARRENT	109																																																																																														
Vietnam_H5	1		MENIKLFAIVSEVRSD		QICGVHNNSTDTDTYLENHTYTFHSNNEINSHNGKGLTGLTAPQI		QFVAGVILGIMRCELE		LSREWSITTEARRENT	108																																																																																														
Brisbane_H3	1	MKTI	I	ALS	Y	AC	VFQK	PGN	NT	AT	AL	GL	CH	HE	V	EN	HT	Y	T	F	H	S	N	N	E	I	N	S	H	N	G	K	G	L	T	G	L	T	A	P	Q	I	Q	F	V	A	G	V	I	L	G	I	M	R	C	E	L	E		LSREWSITTEARRENT	115																																											
Brisbane_H1	110	G	H	F	A	D	V	E	E	L	R	G	O	L	S	A	S	T	F	E	R	F	E	P	K	S	S	N	R	E	V	T		GUS	V	G	S	I	N	G	E	S	T	V	N	L	L	W	I	G	H	G	L	Y	N	E	S	A	N	N	K	E	R	E	V	E	V	L	M	G	N	H	H	P	H	I	G	K	A	L	H	T	E	N	A	T	Y	S	V	S	H	E	S	R	K	E		226						
California_H1	110	G	O	F	I	B	E	E	L	R	G	O	L	S	A	S	T	F	E	R	F	E	P	K	S	S	N	R	E	V	T		GUS	V	G	S	I	N	G	E	S	T	V	N	L	L	W	I	G	H	G	L	Y	N	E	S	A	N	N	K	E	R	E	V	E	V	L	M	G	N	H	H	P	H	I	G	K	A	L	H	T	E	N	A	T	Y	S	V	S	H	E	S	R	K	E		227							
Vietnam_H5	109	G	O	F	I	B	E	E	L	R	G	O	L	S	A	S	T	F	E	R	F	E	P	K	S	S	N	R	E	V	T		GUS	V	G	S	I	N	G	E	S	T	V	N	L	L	W	I	G	H	G	L	Y	N	E	S	A	N	N	K	E	R	E	V	E	V	L	M	G	N	H	H	P	H	I	G	K	A	L	H	T	E	N	A	T	Y	S	V	S	H	E	S	R	K	E		225							
Brisbane_H3	116	Y	D	V	P	E	A	S	E	R	S	E	L	S	G		T	L	E	F	N	N	E	S	N	T	G	V	T		Q	T	S	A	C	I	R	P	N	N	S	E	R	N	N	E	L	H	L	K	E	A	L	Y	T	M	P	N	K	E	F	A	E	V	I	N	G	N	H	E	V	D	N	N	I	F	I	A	Q	S	G	R	I	T	S	E	S	Q	T	V		229												
Brisbane_H1	227	T	P	E	R	K	R	V	D	E	G	R	I	N	G	Y	T	W	T	E	R	F	G	I	T		I	E	R	K	N	I	A	R	K	A	L	S	G	T	E	S	I	N	S	N	M	D	K	D	A	K	O	G	N	E	S	E	F	D	N	H	P	N	T	E	C	P	E	V	R	S	A	R	K	A	V	E	L	I	N	E	R	S		344																		
California_H1	228	K	D	E	S	I	D	R	V	X	X	G	O	N	N	Y	V	T	L	G	P	O	K		T	E	R	I	G	N	L	V	V	E	A	S	E	R	N	A	S	G	I	S	D	I	V	H	O	T		T	C	O	N	K	O	N	N	S	A	P	E	O	N	I	H	O	T		I	S	C	O	N	N	A	S	I	N	E	A	L	E	R	S		345																
Vietnam_H5	226	V	E	R	I	T	S	V	N	G	E	S	O	R	N	E	F	E	N	T	E	L	R	I	N	D	A		N	E	S	N	G	H	F	A	R	E	N	A	N	V	K	O	D	T	A	N	K	S	E	L	Y	N	E	N	T	E	R	I	G	E	P	N	T	E	S	A	R	K	A	V	E	L	I	N	E	R	S		343																							
Brisbane_H3	230	I	E	N	G	S	R	P	R	V	E	N	I	P	S	R	E		I	T	W	T	E	R	F	G	I	T		L	I	N	S	T	C	H	I	N	T	R	O	V	E	R		S	E	K	S	I	M	R	S	T	A	P	I	S	K	C	N	E	C	I	N	S	I	P	N	D	E	F	E	R	N	H	E	V	S	A	E	P	R	I	V	A	K	O	I	E	K	A	T	O	N	V	E	K	S	T	R	G		346
Brisbane_H1	345	L	F	G	A	I	A	G	F	E	G	G	W	G	N	D	G	M	G	Y	H	Q	N	E	Q	A	S	V	A	N	Q	K	S	T	O	H	A	N	G		I	T	H	E	N	I	E	L	N	I	O	T	A	U	C	E	S	N	K	I	E	R	N	E	L	R	A	H	O	N	G	E	I	D	N	Y	A	B	E	L	I	N	E	N	T		462																	
California_H1	346	L	F	G	A	I	A	G	F	E	G	G	W	G	N	D	G	M	G	Y	H	Q	N	E	Q	A	S	V	A	N	Q	K	S	T	O	H	A	N	G		I	T	H	E	N	I	E	L	N	I	O	T	A	U	C	E	S	N	K	I	E	R	N	E	L	R	A	H	O	N	G	E	I	D	N	Y	A	B	E	L	I	N	E	N	T		463																	
Vietnam_H5	344	L	F	G	A	I	A	G	F	E	G	G	W	G	N	D	G	M	G	Y	H	Q	N	E	Q	A	S	V	A	N	Q	K	S	T	O	H	A	N	G		I	T	H	E	N	I	E	L	N	I	O	T	A	U	C	E	S	N	K	I	E	R	N	E	L	R	A	H	O	N	G	E	I	D	N	Y	A	B	E	L	I	N	E	N	T		461																	
Brisbane_H3	347	L	F	G	A	I	A	G	F	E	G	G	W	G	N	D	G	M	G	Y	H	Q	N	E	Q	A	S	V	A	N	Q	K	S	T	O	H	A	N	G		I	T	H	E	N	I	E	L	N	I	O	T	A	U	C	E	S	N	K	I	E	R	N	E	L	R	A	H	O	N	G	E	I	D	N	Y	A	B	E	L	I	N	E	N	T		464																	
Brisbane_H1	465	E	N	V	E	D	I	K	N	A	T	E	I	G	N	S	C	T	E	F	A	R	E	N	D	R	O	N	E		V	A	N	T	I	D	P	K	S	E	S	N	R	E	N	D	I	G	T	E	S	V	A	S	I	L		V	A	L	E	N	A	T	S	N	G	S	I	O	E	R	I	C		505																												
California_H1	464	E	R	V	E	D	I	K	N	A	T	E	I	G	N	S	C	T	E	F	A	R	E	N	D	R	O	N	E		V	A	N	T	I	D	P	K	S	E	S	N	R	E	N	D	I	G	T	E	S	V	A	S	I	L		V	A	L	E	N	A	T	S	N	G	S	I	O	E	R	I	C		506																												
Vietnam_H5	462	O	E	V	E	L	O	K	R	A	A	L	I	N	S	C	T	E	F	A	R	E	N	D	R	O	N	E		V	A	N	T	I	D	P	K	S	E	S	N	R	E	N	D	I	G	T	E	S	V	A	S	I	L		V	A	L	E	N	A	T	S	N	G	S	I	O	E	R	I	C		504																													
Brisbane_H3	465	E	N	T	I	H	O	L	E	N	E	D	N	G	S	C	T	E	F	A	R	E	N	D	R	O	N	E		V	A	N	T	I	D	P	K	S	E	S	N	R	E	N	D	I	G	T	E	S	V	A	S	I	L		V	A	L	E	N	A	T	S	N	G	S	I	O	E	R	I	C		506																													

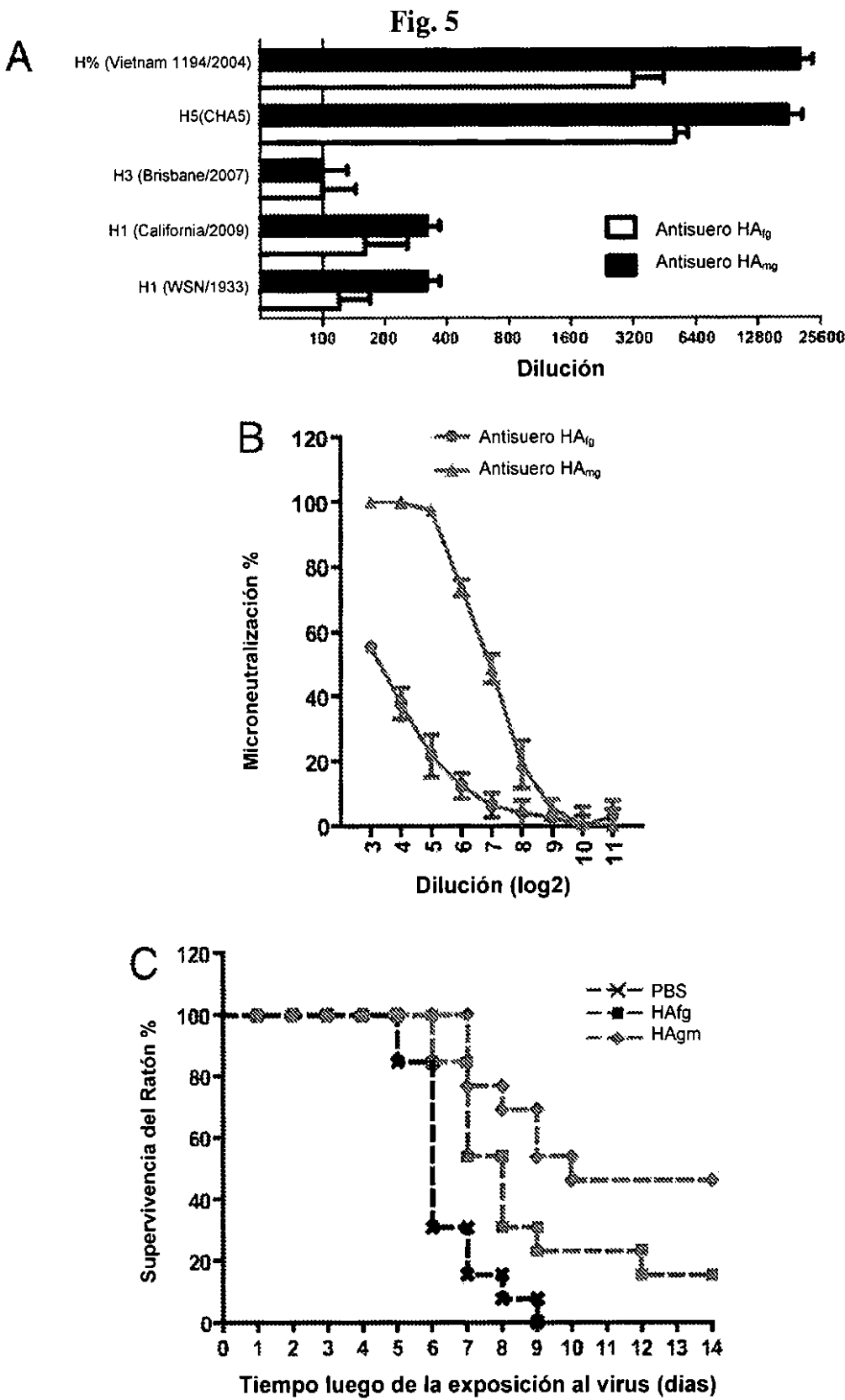


Fig. 5D

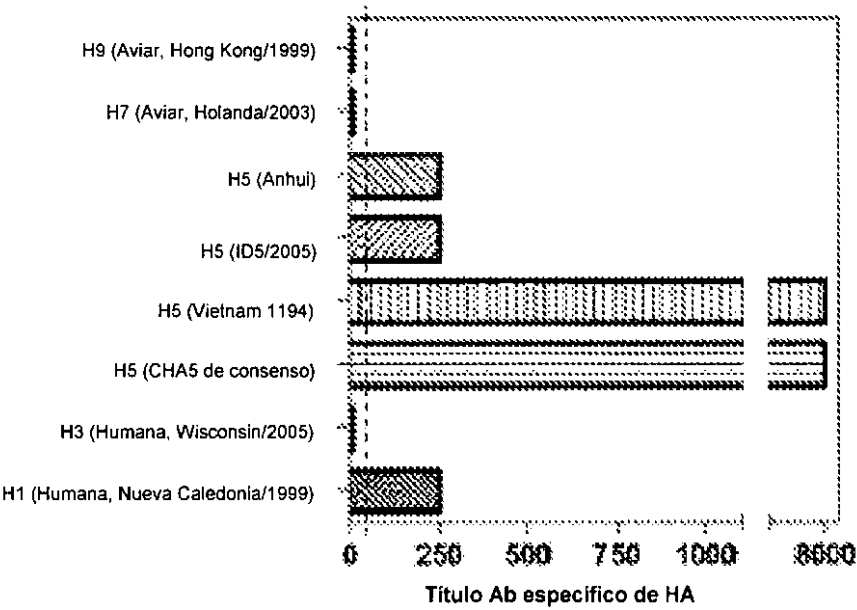


Fig. 6

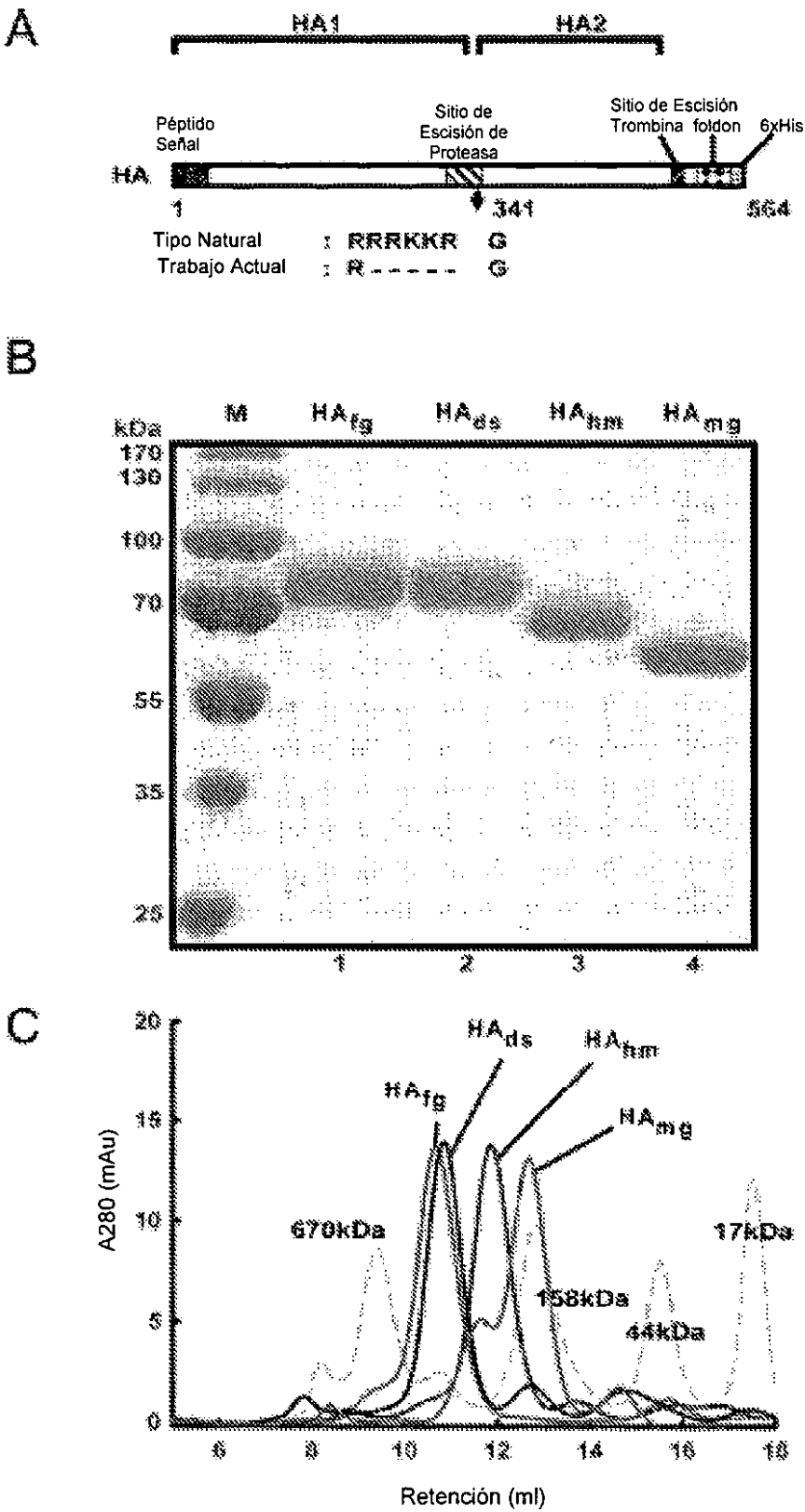


Fig. 7

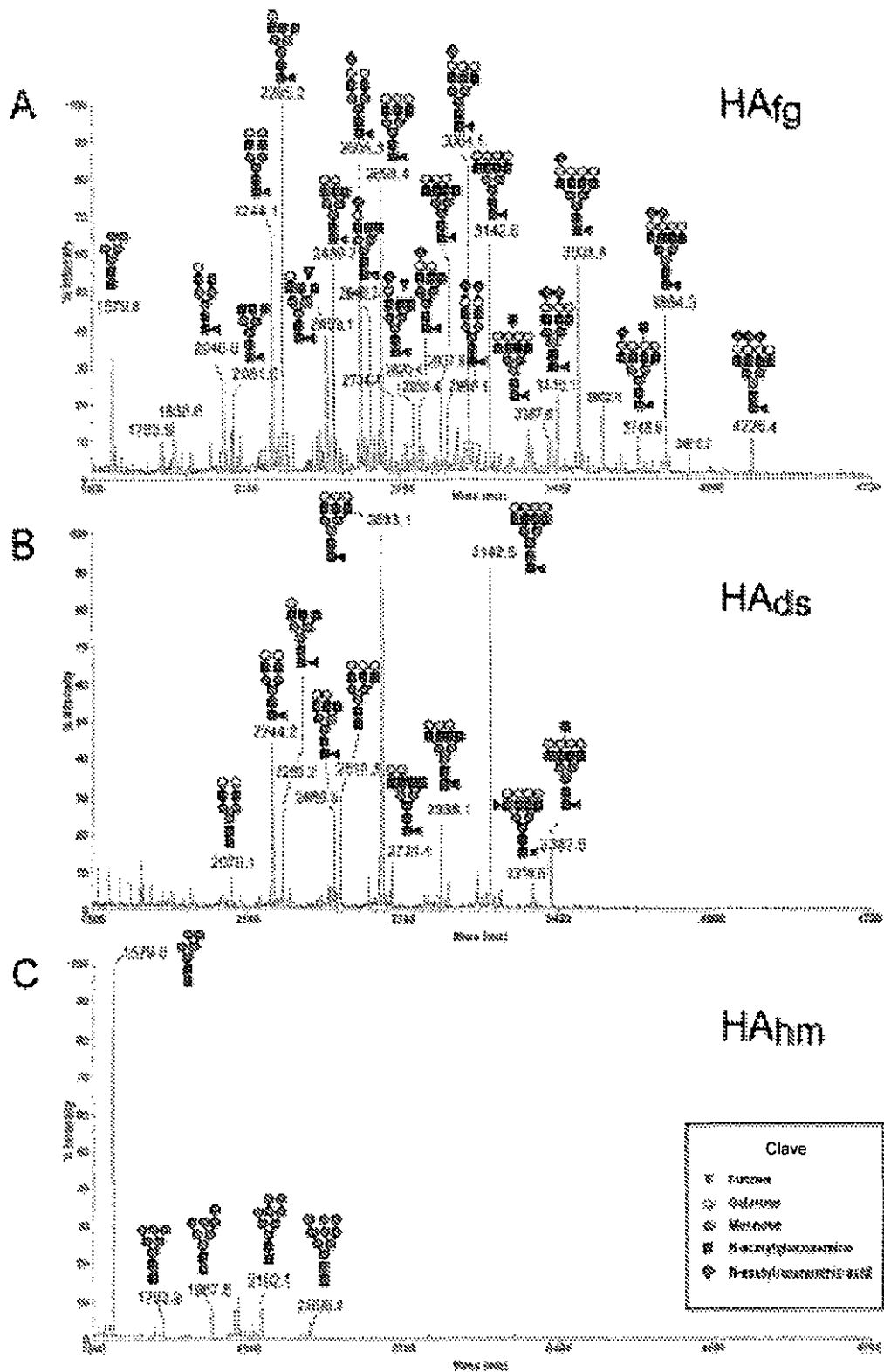


Fig. 9

Composición N-glicano	(m/z)		
	HA _{fg}	HA _{dt}	HA _{lm}
Hex ₇ HexNAc ₁	1579.7	1579.9	1579.8
Hex ₆ HexNAc ₂	1783.9	1783.9	1783.9
Hex ₅ HexNAc ₄ Fuc ₁	1835.6	1835.8	ND
Hex ₇ HexNAc ₂	1988.0	1987.4	1988.0
Hex ₄ HexNAc ₄ Fuc ₁	2040.0	2040.1	ND
Hex ₅ HexNAc ₃ Fuc ₁	2081.0	2081.2	ND
Hex ₅ HexNAc ₃	2192.1	2192.2	2192.1
Hex ₅ HexNAc ₄ Fuc ₁	2244.1	2244.2	ND
Hex ₅ HexNAc ₃ Fuc ₁	2285.1	2285.2	ND
Hex ₅ HexNAc ₃	2396.2	2396.2	2396.2
Hex ₅ HexNAc ₃ Fuc ₁	2489.2	2489.3	ND
Hex ₅ HexNAc ₄ Fuc ₁ NeuAc ₁	2605.3	ND	ND
Hex ₅ HexNAc ₃ Fuc ₁	2693.3	2693.4	ND
Hex ₅ HexNAc ₄ Fuc ₁	2734.4	2734.4	ND
Hex ₅ HexNAc ₃ Fuc ₁ NeuAc ₁	2850.4	ND	ND
Hex ₅ HexNAc ₃ Fuc ₁	2938.5	2938.5	ND
Hex ₅ HexNAc ₄ Fuc ₁ NeuAc ₂	2966.5	ND	ND
Hex ₅ HexNAc ₃ Fuc ₁ NeuAc ₁	3054.5	ND	ND
Hex ₅ HexNAc ₃ Fuc ₁	3142.6	3142.5	ND
Hex ₅ HexNAc ₄ Fuc ₂	3316.5	3316.6	ND
Hex ₅ HexNAc ₃ Fuc ₁	3387.8	3387.6	ND
Hex ₅ HexNAc ₃ Fuc ₁ NeuAc ₂	3415.7	ND	ND
Hex ₅ HexNAc ₃ Fuc ₁ NeuAc ₁	3503.8	ND	ND
Hex ₅ HexNAc ₃ Fuc ₂ NeuAc ₁	3677.9	ND	ND
Hex ₅ HexNAc ₃ Fuc ₁ NeuAc ₃	3776.9	ND	ND
Hex ₅ HexNAc ₃ Fuc ₁ NeuAc ₂	3865.0	ND	ND
Hex ₅ HexNAc ₄ Fuc ₂ NeuAc ₂	4038.0	ND	ND
Hex ₅ HexNAc ₃ Fuc ₁ NeuAc ₃	4225.2	ND	ND
Hex ₅ HexNAc ₄ Fuc ₁ NeuAc ₄	4586.5	ND	ND

Fig. 10

	1	2	3	4	5	6	7	8
HA _{lg} → HA _{dt}	-0.550	-0.245	-0.371	0.007	ND	-0.462	0.097	-0.001
HA _{lg} → HA _{hm}	-0.731	-0.441	-0.929	0.122	ND	-1.235	-0.918	-0.146
HA _{lg} → HA _{mg}	-1.770	-1.616	-1.587	-0.405	ND	-1.904	-0.327	-1.169
HA _{dt} → HA _{hm}	-0.181	-0.196	-0.558	0.114	0.334	-0.773	-0.115	-0.244
HA _{dt} → HA _{mg}	-1.220	-1.371	-1.216	-0.492	-1.275	-1.442	-0.425	-1.169
HA _{hm} → HA _{mg}	-1.039	-1.175	-0.558	-0.607	-1.609	-0.669	-0.310	-0.923

	9	10	11	12	13	14	15
HA _{lg} → HA _{dt}	ND	-0.439	-0.582	ND	-0.579	-0.683	-0.348
HA _{lg} → HA _{hm}	ND	-1.103	-1.032	-1.556	-1.403	-1.097	-0.614
HA _{lg} → HA _{mg}	ND	-1.793	-1.790	-1.944	-2.294	-2.005	-1.944
HA _{dt} → HA _{hm}	-0.726	-0.667	-0.470	ND	-0.928	-0.414	-0.166
HA _{dt} → HA _{mg}	-1.601	-1.347	-1.228	ND	-1.720	-1.322	-1.597
HA _{hm} → HA _{mg}	-0.875	-0.680	-0.758	-0.188	-0.991	-0.908	-1.330

ΔΔG de variantes glucosiladas de HA en respuesta a los sialósidos α2,3 1-15

Fig. 11

	HA _g	HA _d	HA _m	HA _{ng}
1 → 2	-0.384	-0.079	-0.094	-0.230
1 → 3	-0.279	-0.100	-0.477	-0.026
1 → 6	0.617	0.705	0.113	0.469
1 → 9	-0.610	-0.059	-0.132	-0.010
1 → 9	ND	0.999	0.454	0.619
9 → 10	0.659	0.223	-0.200	0.043
9 → 11	0.526	-0.035	-0.260	-0.095
9 → 12	1.646	ND	0.236	0.970
9 → 15	-0.023	-0.370	-0.382	-0.790
3 → 4	-1.653	-1.275	-0.602	-0.551
3 → 5	ND	0.469	1.381	0.410
6 → 7	-2.044	-1.494	-0.926	-0.467
13 → 14	-0.117	-0.226	0.188	0.172

Diferencias en variaciones de energía libre de unión entre diferentes ligandos sialósidos en respuesta a variantes de HA

7/7

Fig. 12

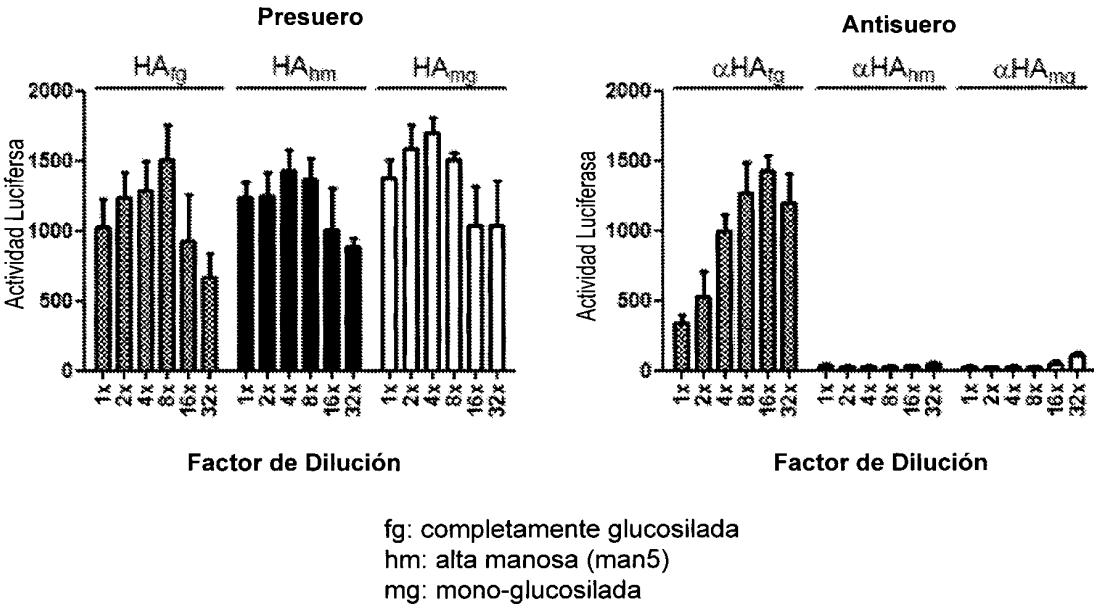
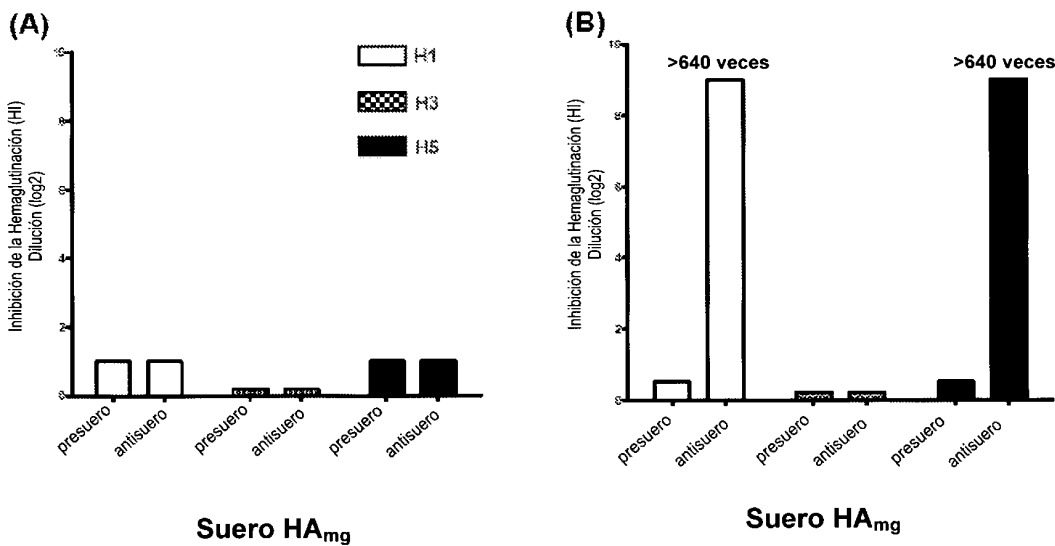
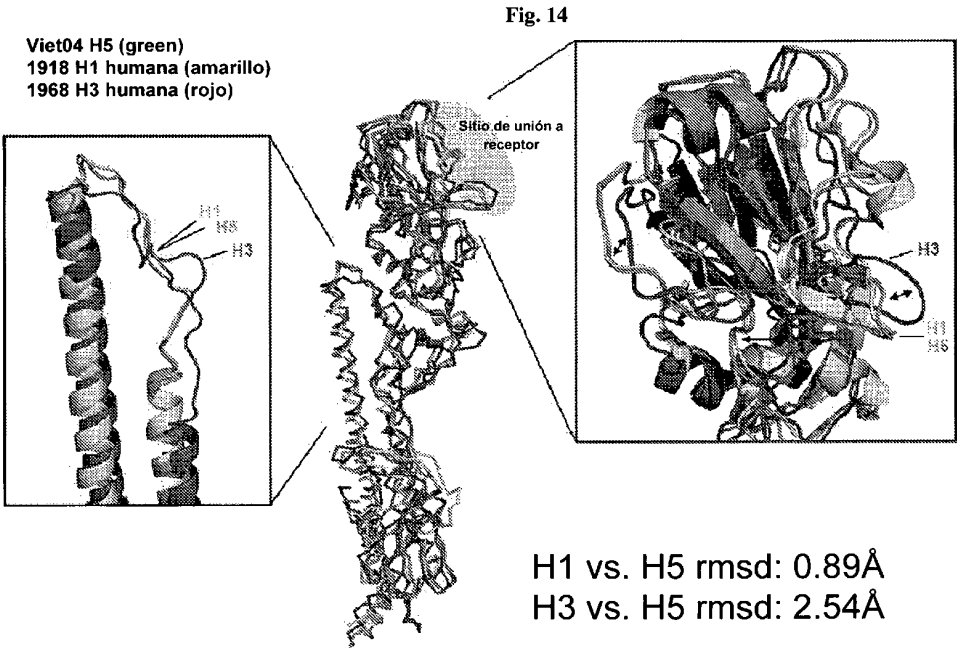


Fig. 13



HA_{fg} y HA_{mg} denotan completamente glucosilada y mono-glucosilada H5 de consenso como antígenos para antisuero de conejo.

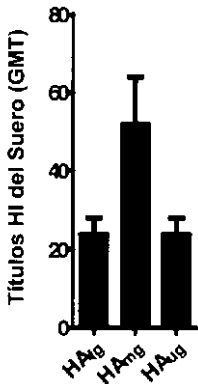


100

A

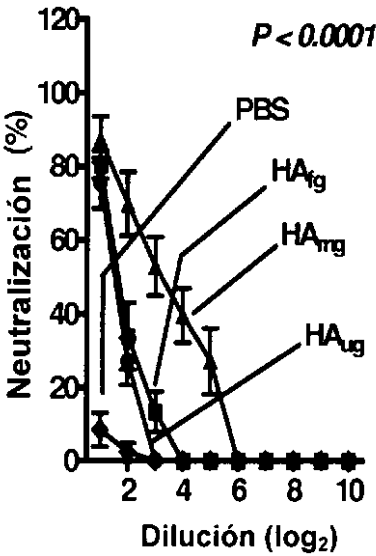
Inhibición de la Hemaglutinación

Fig. 15



B

Microneutralización



C

Exposición y Supervivencia

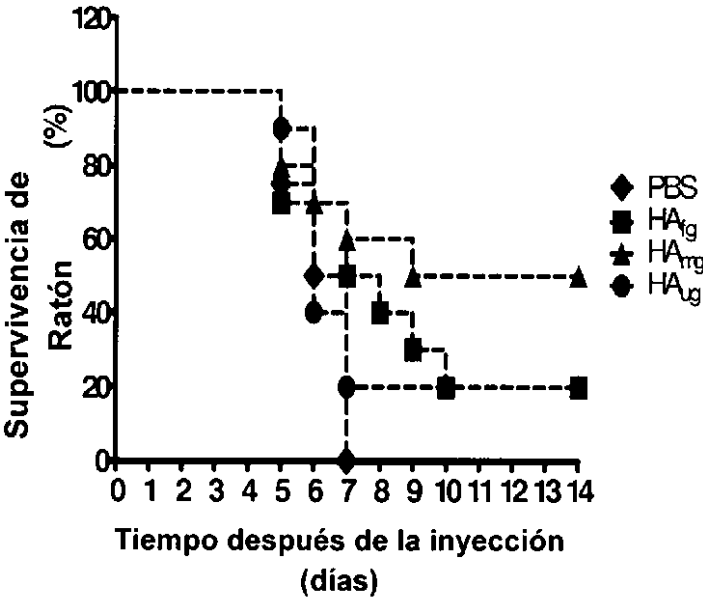


Fig. 16

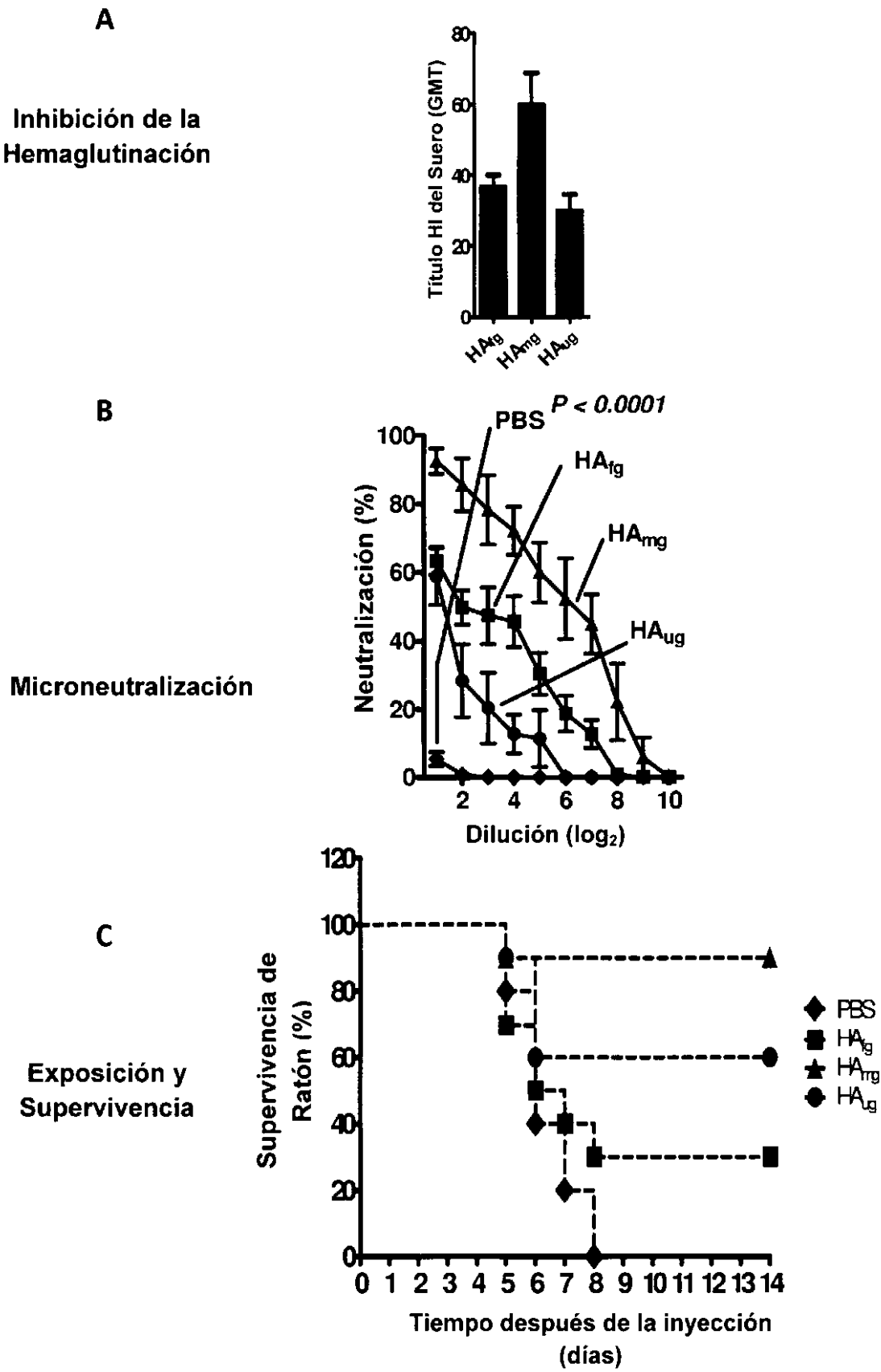


Fig. 17

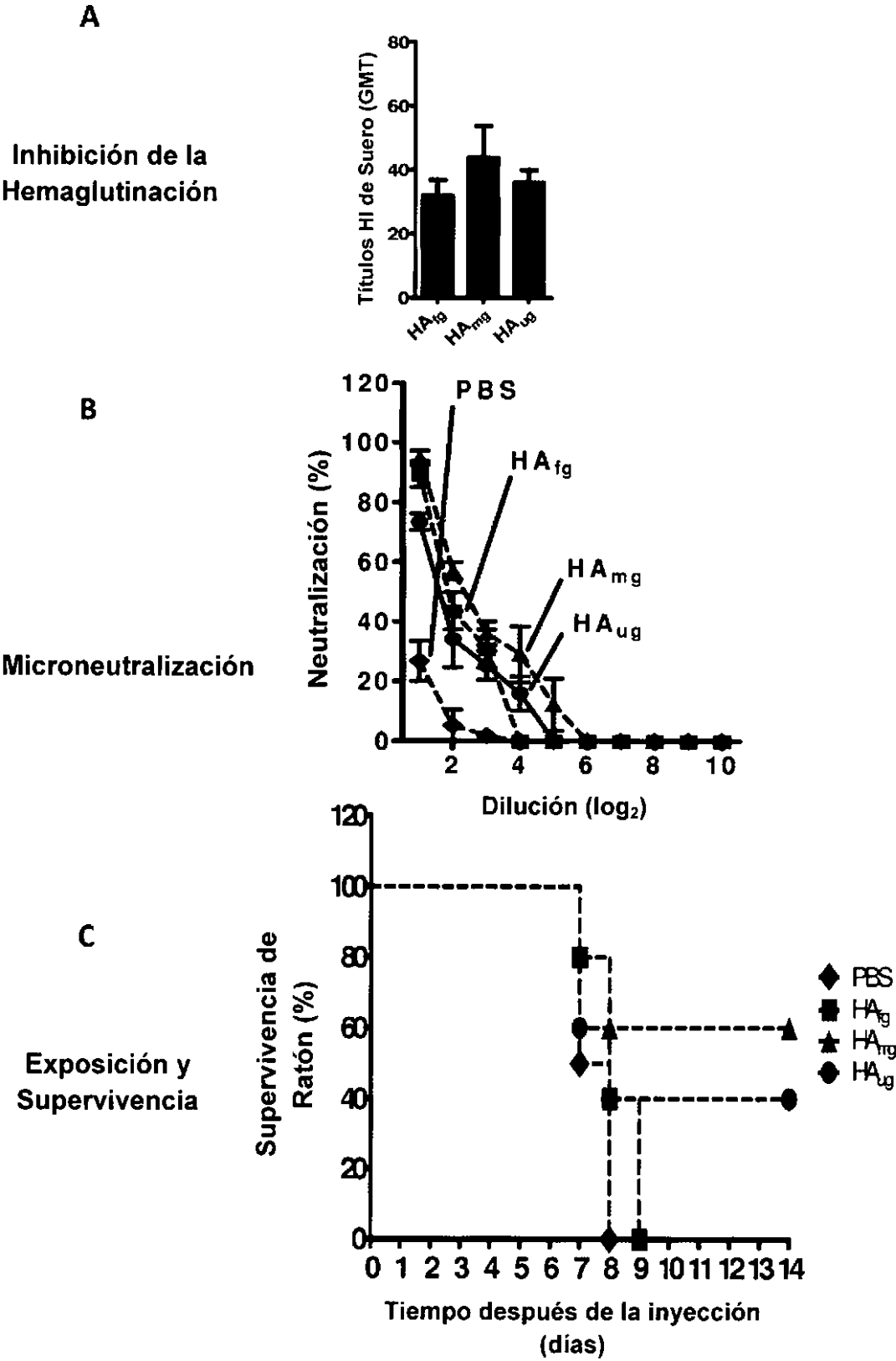
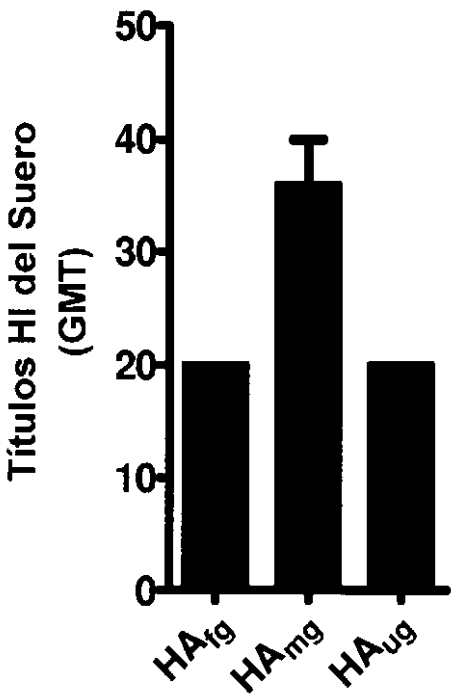
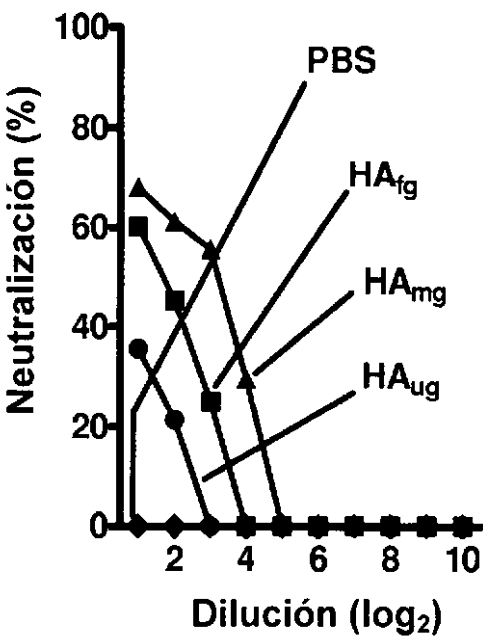


Fig. 18

A Antisueros: H1 (California/2009)
 Virus: WSN (H1N1)



B Antisueros: H1 (California/2009)
 Virus: WSN (H1N1)



104

Fig. 19

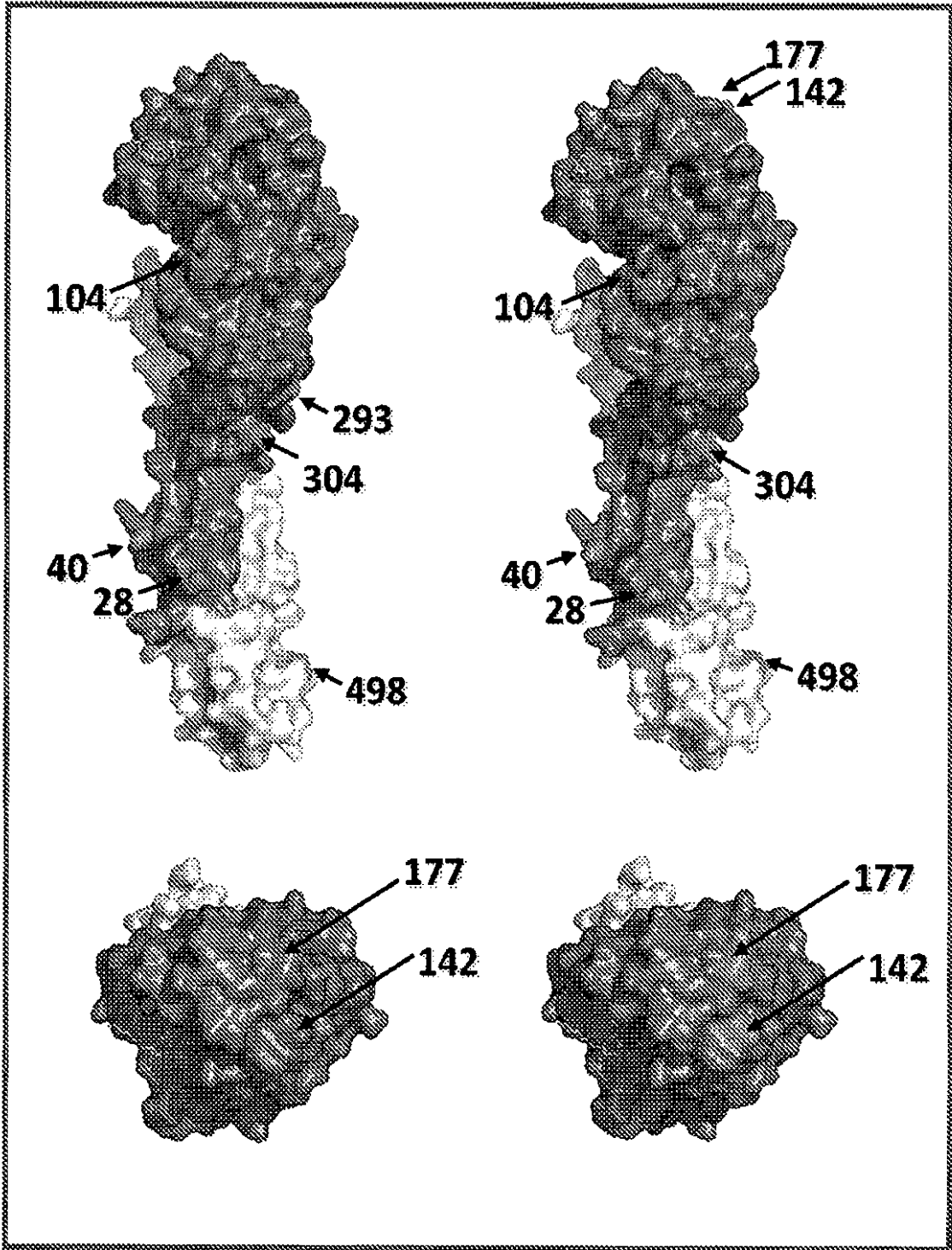


Fig. 20

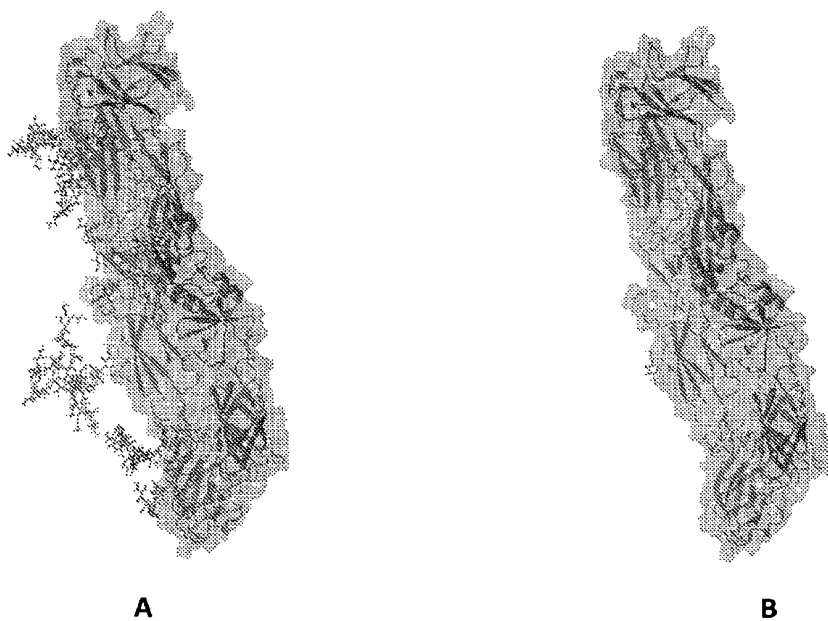
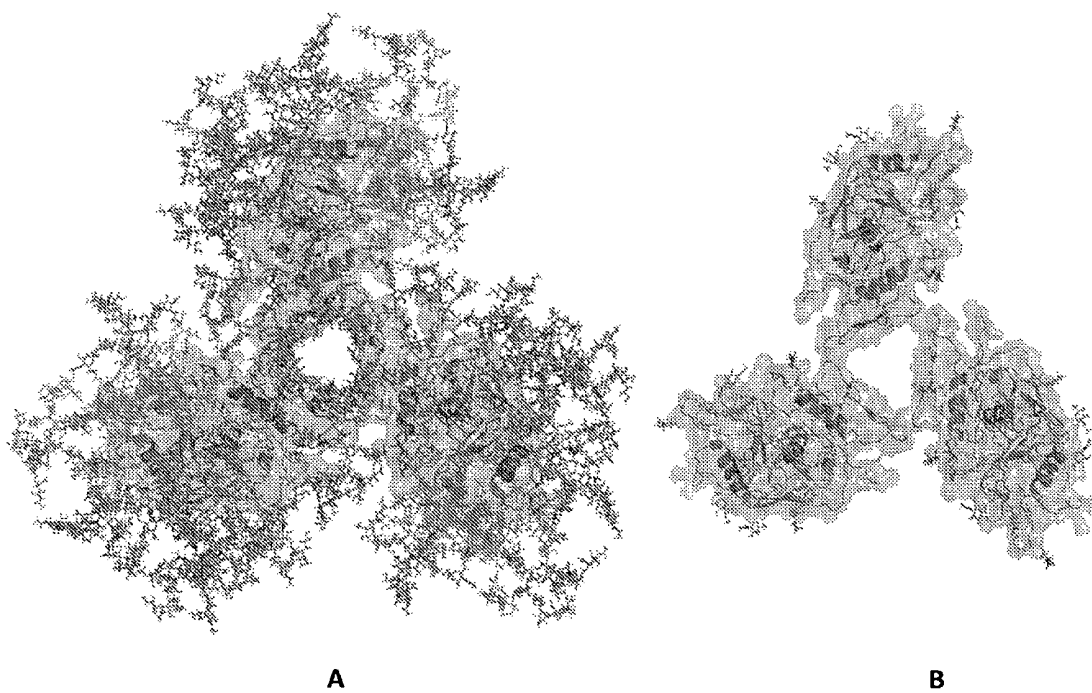


Fig. 21





No. 11-144904-00000-0000

Fecha: 2011-10-26 16:57:03

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Trá. 11 PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 156

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTIL

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☒	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐