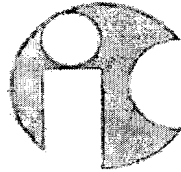




No. 13-111806- -00000-0000

Fecha: 2013-05-03 16:17:19 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 53



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO: MÉTODOS PARA PRODUCIR PARTÍCULAS DE VIRUS CON GLUCOSILACIÓN SIMPLIFICADA DE PROTEÍNAS DE SUPERFICIE

51. CLASIFICACION INTRNACIONAL C12P 21/06

71. SOLICITANTE: ACADEMIA SINICA

DOMICILIO: Taipéi, China

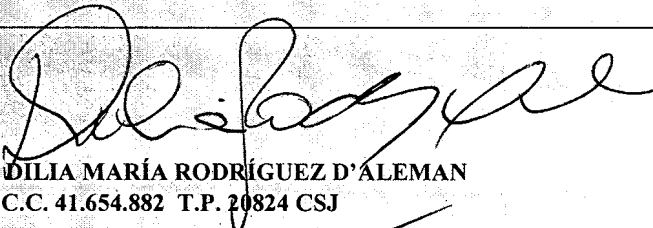
74. APODERADO DILIA RODRIGUEZ D'ALEMAN

22. BOGOTÁ, D.C.,

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 13-111806- -00000-0000 Fecha: 2013-05-03 16:17:19 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 53
--	---

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL – PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No. PCT/ US2011/059449 Fecha 04 de Noviembre de 2011			
Publicación Internacional No. WO 2012/061776 A1 Fecha 10 de Mayo de 2012			
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)		
MÉTODOS PARA PRODUCIR PARTÍCULAS DE VIRUS CON GLUCOSILACIÓN SIMPLIFICADA DE PROTEÍNAS DE SUPERFICIE			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP) C12P 21/06		
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL ACADEMIA SINICA		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN TIPO
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN: 128 Academia Road Section 2 Nankang CORREO ELECTRONICO:			
CIUDAD: Taipei 11529, LUGAR DE CONSTITUCIÓN: China			
PAÍS DE RESIDENCIA: China			
7	INVENTOR (ES)		
APELLIDOS 1.WONG, 2.MA, 3.TSENG,		NOMBRES Chi-Huey Che Yung-Chieh	NACIONALIDAD Estadounidense Chino Chino
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
DIRECCIÓN 1. 10550 N. Torrey Pines Road, 2. 15F, #54 Dongshi Street Xizhi Dist. , 3.5F., #138, Yongli Rd. Yonghe Dist.		CIUDAD La Jolla, New Taipei City 221, New Taipei City 234,	ESTADO California 92037, PAÍS RESIDENCIA Estados Unidos de América China China
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.			
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
APELLIDOS RODRIGUEZ D'ALEMAN		NOMBRES DILIA MARIA	IDENTIFICACIÓN C.C.41.654.882 T.P.20824 CSJ
DIRECCIÓN Cra. 11 No. 86 – 53, Piso 6		No. TELÉFONO 6181088	
CIUDAD Bogotá, D.C.		CORREO ELECTRÓNICO notificaciones@clarkemodet.com.co.	
PAÍS Colombia			
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO		
(33) PAÍS DE ORIGEN Estados Unidos de América		CÓDIGO PAÍS US	(31) NÚMERO 61/410.257
			(32) FECHA AAA/MM/DD 2010/11/04

11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS		
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.			
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES		
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.			
13	REDUCCIÓN DE TASAS		
Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐			
Universidades públicas o privadas ☐			
Entidades sin ánimo de lucro ☐			
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☐ NO		
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.			
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	Nº 13-040837 13-041538	Fecha 30/04/2013 03/05/2013
16	FIRMA DEL APODERADO :		
 DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN C.C. 41.654.882 T.P. 20824 CSJ			
17	ANEXOS		
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano		Documentación Jurídica	
1. ☒ Descripción Nº de folios: 37		9. ☐ Poderes, si fuera el caso.	
2. ☒ Reivindicaciones Nº Reivindicaciones: 34		10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.	
3. ☒ Dibujos y/o figuras Nº folios: 4		11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
4. ☒ Resumen.		12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.		13. Reducción de tasas	
6. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.		Micro, pequeñas o medianas empresas	
7. ☐ Arte final 12 x 12.		☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.	
8. ☐ Anexo formato digital.		☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.	
		Universidades públicas o privadas	
		☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación	
		Entidades sin ánimo de lucro	
		☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.	
		☐ Hoja de información complementaria.	
		☐ Otros, especificar	
		14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.	
		15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.	
		16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.	
		17. ☒ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.	

**MÉTODOS PARA PRODUCIR PARTÍCULAS DE VIRUS CON GLUCOSILACIÓN
SIMPLIFICADA DE PROTEÍNAS DE SUPERFICIE**

INVENTORES:

Chi-Huey WONG, Che MA y Yung-Chieh TSENG

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud de Patente provisional Estadounidense No. de Serie 61/410,257, presentada el 4 de noviembre, 2010 y titulada "MÉTODOS PARA PRODUCIR HEMAGLUTININA CON VIRUS DE INFLUENZA MONOGLUCOSILADO" cuyos contenidos se incorporan aquí en su totalidad como referencia.

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con virus y en particular con la producción de partículas de virus con glucanos simplificados. En particular, la presente invención se relaciona con la producción de partículas de virus de influenza con glucosilación simplificada. Específicamente, la invención se relaciona con métodos para producción de partículas de virus de influenza monoglucosilada.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La invención se describe aquí en términos de la preparación de ejemplo de virus de influenza monoglucosilados. Se contempla que se pueden utilizar los mismos métodos para preparar otros virus con estructura de glucano simplificada que incluyen retrovirus tales como el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y

000002

flaviviridae tal como virus de dengue, virus del Nilo Occidental, virus de hepatitis C (HCV) y similares.

La influenza es provocada por un virus de ARN de la familia ortomixoviridae. Existen tres tipos de estos virus y provocan tres tipos diferentes de influenza: tipo A, B y C. Los virus de influenza tipo A infectan los mamíferos (humanos, cerdos, hurones, caballos) y aves. Esto es muy importante para la humanidad, ya que este es el tipo de virus que ha provocado pandemias en todo el mundo. El virus de la influenza tipo B (también conocido simplemente como influenza B) infecta solo los humanos. Ocasionalmente provoca brotes locales de virus flu. Influenza C que también infectan solo a los humanos. Infectan la mayoría de las personas cuando son jóvenes y no suelen provocar enfermedades graves.

Los virus de influenza A infectan una amplia variedad de mamíferos, que incluyen hombres, caballos, cerdos, hurones y aves. Los principales patógenos humanos se asocian con epidemias y pandemias. Existe por lo menos 1 serotipo de hemaglutinina (H) conocido y 9 serotipos de neuraminidasa (N) conocidos. Se considera que los cerdos y aves son reservorios particularmente importantes, que generan grupos de virus genética y antígenicamente diversos que se transfieren de nuevo a la población humana a través de contacto cercano entre humanos y animales. Los virus de influenza B infectan solo a los mamíferos y provocan enfermedades, pero generalmente no tan graves como los tipos A. A diferencia del virus de influenza A, el virus de influenza B no tienen serotipos que se puedan distinguir. Los

virus de influenza C también infectan solo a los mamíferos, pero raramente provocan enfermedad. Ellos se distinguen genética y morfológicamente de los tipos A y B.

Existen 4 antígenos presentes en el virus de influenza, la hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA), nucleocápsido (NA), la matriz (M) y las proteínas de nucleocápsido (NP). El NP es un antígeno de tipo específico que ocurre en 3 formas, A, B y C, que proporcionan la base para la clasificación de virus de influenza humanos. La proteína de matriz (proteína M) rodea el nucleocápsido y compensa el 35-45% de la masa de partícula. Se observan dos glucoproteínas de superficie sobre la superficie como proyecciones en forma de barra. La hemaglutinina (HA) se sintetiza inicialmente como un precursor trimérico (HAO) que contiene tres cadenas de proteína idénticas, cada una de las cuales se procesa proteolíticamente en dos subunidades, HA1 y HA2, que se mantienen juntas covalentemente mediante un enlace de disulfuro único. El HA media la adhesión del virus al receptor celular. Las moléculas de neuraminidasa (NA) están presentes en menores cantidades en la envoltura. Las cepas humanas circulantes son notorias por su tendencia a acumular mutaciones año tras año y provocan epidemias recurrentes.

En los eucariotas, los residuos de azúcar se ligan comúnmente a cuatro diferentes residuos de aminoácidos. Estos residuos de aminoácidos se clasifican como ligados a O (serina, treonina, y hidroxilisina) y ligados a N (asparagina). Los azúcares ligados a O se sintetizan en el Golgi o Retículo Endoplasmático rugoso (ER) a partir de azúcares de nucleótido. Los azúcares ligados a N se

000004

sintetizan a partir de un precursor común, y se procesan posteriormente. Se sabe que la adición de cadenas de carbohidrato ligadas a N es importante para la estabilización del plegado, prevención de degradación en el retículo endoplasmático, oligomerización, actividad biológica, y transporte de glucoproteínas. La adición de oligosacáridos ligados a N para especificar residuos de Asn cumple una función importante en regular la actividad, estabilidad o antigenicidad de las proteínas maduras de virus (Opdenakker G. et al *FASEB Journal* 7, 1330-1337 1993). También se sugiere que se requiere glucosilación ligada a N para plegado, transporte, expresión de superficie celular, secreción de glucoproteínas (Helenius, A., *Molecular Biology of the Cell* 5, 253-265 1994), protección de la degradación proteolítica y mejora de la solubilidad de glucoproteína (Doms et al., *Virology* 193, 545-562 1993). Las glucoproteínas víricas de superficie no se requieren para plegado correcto de proteína, pero tampoco proporciona protección contra los anticuerpos de neutralización como un "escudo de glucano". Como resultado, la fuerte selección específica de anfitrión se asocia frecuentemente con las posiciones de codón de la glucosilación ligada a N potencial. Por consiguiente los sitios de glucosilación ligada a N tienden a ser conservados a través de cepas y subtipos.

Los brotes de virus de influenza A continúan provocando morbilidad generalizada y mortalidad en todo el mundo. Solo en los Estados Unidos un estimado de 5 a 20% de la población está infectado por virus de influenza A anualmente, provocando aproximadamente 200,000 hospitalizaciones y 36,000 muertes.

000075

establecimiento de políticas integrales de vacunación ha sido una medida eficaz para limitar morbilidad por influenza. Sin embargo, la deriva genética frecuente del virus requiere reformulación anual de la vacuna, potencialmente conduce a un desajuste entre la cepa vírica presente en la vacuna y aquella que circula. Por lo tanto, las terapias antivíricas contra el virus de la influenza son importantes herramientas para limitar la severidad de la enfermedad así como también su transmisión.

Los virus de la influenza H5N1 altamente patogénicos han provocado brotes en aves de corral y aves silvestres desde el 2003 (Li K S et al. (2004) *Nature* 430:209-213). Desde febrero de 2010, estos virus han infectado no solo las especies aviares sino también más de 478 humanos, de los cuales 286 casos han probado ser fatales (www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2010_02_111_en/index.html). El H5N1 altamente patogénico y los virus de influenza de origen porcino A (H1N1) del 2009 han provocado brotes globales y han planteado una gran preocupación de que pueda ocurrir cambios adicionales en los virus que lleven a una pandemia mortal (Garten R J, et al. (2009) *Science* 325: 197-201, Neumann G, et al. (2009) *Nature* 459:931-939). Surge una gran preocupación de que un virus de la influenza pudiera adquirir la capacidad de propagarse de forma eficiente entre los humanos, convirtiéndose por lo tanto en una amenaza de pandemia. Una vacuna contra la influenza, por lo tanto, debe ser una parte integral de cualquier plan de preparación para una pandemia.

000006

Han surgido contribuciones importantes al entendimiento de las infecciones de influenza a partir de estudios sobre hemaglutinina (HA), una glucoproteína de cubierta vírica que se une a los receptores de glucanos sialilados específicos en las vías respiratorias, lo que permite que el virus entre en 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 cruzar la barrera de especie e infectar a la población humana, el HA aviar debe cambiar su preferencia de unión al receptor desde un glucano terminalmente sializado que contiene motivos de ácido siálico ligados a $\alpha 2, 3$ (aviar) a ligados a $\alpha 2, 6$ (humanos) (Connor RJ, et al. (1994) *Virology* 205:17-23), y este cambio podría ocurrir a través de sólo dos mutaciones, como en la pandemia de 1918 (Tumpey TM, et al. (2007) *Science* 315:655-659). Por lo tanto, la comprensión de los factores que afectan la influenza que se une a los receptores de glucanos es fundamental para el desarrollo de métodos para controlar cualesquier cepas de influenza de cruce futuras que tengan potencial pandémico.

La hemaglutinina del virus de influenza (HA) es una proteína de una cabeza globular y una región progenitora (Kuiken T, et al. (2006) *Science* 312:394-397). Ambas regiones llevan oligosacáridos ligados a N (Keil W, et al. (1985) *EMBO J* 4:2711-2720), que 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). La HA es la glucoproteína de superficie de virión que adhiere el virus a sus receptores en las células anfitrionas y fusiona la envoltura vírica con las membranas de vesículas

000007

endocíticas para iniciar el proceso infeccioso. (Crecelius D. M., et al. (1984) *Virology* 139, 164-177). También es el componente de virión que estimula la formación de anticuerpos protectores. La naturaleza y extensión de la glucosilación de la HA se han implicado en la alteración de sus propiedades de unión de receptor y en la emergencia de variantes víricas con citopatogenicidad mejorada (Aytay S., Schulze I. T. (1991) *J. Virol.* 65, 3022-3028) y virulencia (Deshpande K. L., et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 36-40) y en enmascarar sus sitios antigénicos (Skehel J. J., et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 1779-1783). La eliminación de mutación de los sitios de glucosilación de HA puede afectar la unión del receptor vírico (Gunther I, et al. (1993) *Virus Res* 27:147-160).

La secuencia de aminoácidos de la HA y por lo tanto se determina la ubicación de sus sitios de N-glucosilación por el genoma vírico. Parece que las estructuras de estos oligosacáridos se determina por su posición en la HA (Keil W., et al. (1985) *EMBO J.* 4, 2711-2710) y por las enzimas biosintéticas y enzimas de recorte proporcionadas por la célula anfitriona en la que se hace crecer el virus. La plasticidad del genoma vírico y la maquinaria de glucosilación específica a anfitrión juntos, pueden crear poblaciones de virus que son más heterogéneas en su estructura y función que pueden ser desarrolladas por cualquier proceso solo. Se considera que esta diversidad es responsable de la supervivencia de estos virus y de su capacidad de superar los efectos inhibidores de los anticuerpos de neutralización y agentes antivíricos.

000008

Parece que la HA tiene regiones que se deben glucosilar, otras que se deben estar libres de oligosacáridos, y todavía otros en los que la glucosilación puede ser ventajosa o perjudicial para la supervivencia del virus. Los sitios de glucosilación en determinadas posiciones en la HA del virus de influenza A aislado a partir de varios animales y humanos están altamente conservados y por lo tanto parece ser esencial para la formación y/o mantenimiento del HA funcional (Gallagher P. J., et al. (1992) *J. Virol.* 66, 7136-7145). Por el contrario, la generación de sitios de glucosilación en determinadas regiones de la HA reduce su transporte a la superficie celular, y su estabilidad y/o función (Gallagher P., et al. (1988) *J. Cell Biol.* 107, 2059-2073). Esta está en las regiones en las que la glucosilación no se prohíbe ni se requiere para formación de HA funcionales que pueden tener diversidad de oligosacáridos con un mayor efecto selectivo, que depende del ambiente específico en que se espera que crezcan los virus.

Los cambios en la secuencia de péptidos en o cerca de los sitios de glucosilación puede alterar la estructura 3D del HA, y por lo tanto la especificidad y afinidad de unión del receptor. En efecto, las HA de diferentes subtipos H5N1 tienen diferentes patrones de unión a glucano (Stevens J, et al. (2008) *J Mol Biol* 381: 1382-1394).

Se ha estudiado la mutagenia de sitios de glucosilación sobre H1 y en el sistema vírico completo system (Chandrasekaran A, et al. (2008) *Nat Biotechnol* 26: 107-113; Deom CM, et al. (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* 83:3771-3775). Los cambios en la glucosilación

pueden afectar la afinidad y especificidad de la unión del receptor, especialmente con respecto a la mayor parte del H5N1 HA.

Las regiones menos altamente glucosiladas o no glucosiladas de la hemaglutinina continúan mutando para escapar del sistema inmune del anfitrión. El diseño de vacunas utilizando HA monoglucosilada se describe en la Publicación de Solicitud Patente Estadounidense No. 2010/0247571 (Wong et al). Por lo tanto, hay una necesidad de nuevos y eficientes métodos para producción de partículas monoglucosiladas de virus de influenza.

RESUMEN DE LA INVENCION

La descripción aquí proporciona la demostración de ejemplo para producir virus de influenza de monoglucosilados. Los métodos de ejemplo son igualmente aplicables a la producción de virus con glucanos simplificados sobre las proteínas estructurales. Las regiones conservadas de las proteínas estructurales con alta glucosilación se pueden dirigir para el diseño de vacunas una vez los patrones de glucosilación presentes en estos sitios se simplifican a mono, di-, tri-, u otras regiones glucosiladas.

Específicamente, subsiste una necesidad de cruzar anticuerpos monoclonales de neutralización que se pueden utilizar en el diseño y la validación de los procesos de producción de vacunas que mantienen o mejoran la calidad y antigenicidad de epítopos de neutralización cruzada en las vacunas actuales o futuras. Asumiendo que la unión de anticuerpo a antígeno es reflectiva de la integridad estructural y potencial antigénico, uno podría

intentar la unión de anticuerpos de neutralización, tales como polipéptidos HA monoglucosilados y evalúa cuantitativamente su potencial de neutralización cruzado. Se espera que las vacunas derivadas contra derivados de monoglucosilados de influenza HA incrementen la inmunogenicidad hacia los epítomos universales.

Se genera el antígeno al remover parcialmente los azúcares de la glucoproteína vírica para exponer los sitios de glucosilación (que se conservan altamente y no mutan o no mutan agresivamente) y al mismo tiempo retienen los azúcares adecuados para preservar la estructura terciaria de la glucoproteína. Las glucoproteínas víricas parcialmente glucosiladas se generan al desglucosilar parcialmente las glucoproteínas de tal manera que un sitio de glucosilación particular retiene uno, dos o tres unidades de azúcar. En algunos aspectos se puede generar la glucoproteína parcialmente al proporcionar una proteína o polipéptido no glucosilado en uno o más sitios de glucosilación particulares y conjugar un mono-, di- o tri-sacárido a los sitios de glucosilación.

Se describe una vacuna que comprende por lo menos una glucoproteína HA parcialmente glucosilada y un portador farmacéuticamente aceptable. En algunas implementaciones, la glucoproteína HA parcialmente se selecciona del grupo que consiste de virus de la influenza parcialmente glucosilado H1, H3, y H5.

Se describe un método que comprende administrar a un sujeto susceptible de influenza una vacuna que comprende por lo menos

000011

una glucoproteína HA desglucosilada y un portador farmacéuticamente aceptable. En algunas implementaciones, la glucoproteína HA desglucosilada se selecciona del grupo que consiste de HI, H3, y H5.

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

En algunas modalidades, el antígeno de influenza HA se produce de forma recombinante en un cultivo celular. El cultivo celular comprende células MDCK, células Vero o células Vero PER.C6. La kifunensina se agrega a la célula anfitriona que aloja un antígeno de influenza HA recombinante.

En algunos aspectos, la inhibición de α -mannosidasa I resulta en glucoproteínas con $\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2$. En otras modalidades, el antígeno de influenza HA comprende un virus completo de la influenza. El virus completo de la influenza se hace crecer en un anfitrión de huevo de pollo embrionado libre de patógeno específico (SPF).

000012

Luego, la kifunensina se agrega a la cavidad alantoica del huevo de pollo embrionado libre de patógeno específico (SPF).

En algunos aspectos, la kifunensina se agrega a una concentración de 0.005 a 0.5 mg/ml.

El virus recuperado del antígeno de influenza HA se trata con aproximadamente 0.1 a aproximadamente 100 µg/mL EndoH.

En algunos aspectos, el virus monoglucosilado de la influenza se aísla mediante un método que comprende ultracentrifugación de gradiente de densidad.

En algunos aspectos, el método adicionalmente comprende purificar el virus monoglucosilado del antígeno de influenza HA mediante un método que comprende ultrafiltración. En algunas modalidades, la ultrafiltración comprende el uso de un filtro de 0.2 µm.

En algunos aspectos, el método adicionalmente comprende analizar el virus monoglucosilado de la influenza mediante microscopia electrónica.

En algunos aspectos, el método adicionalmente comprende cuantificar el virus monoglucosilado de la influenza mediante un método que comprende tratamiento con PNGasa. En algunos aspectos, el método adicionalmente comprende cuantificar el virus monoglucosilado de la influenza mediante un método que comprende electrocroatografía SDS-PAGE.

000013

En algunos aspectos, el método adicionalmente comprende analizar la composición de glucano del virus monoglucosilado aislado de la influenza mediante un método que comprende espectrometría de masa.

La invención se relaciona con un virus monoglucosilado del antígeno de influenza HA (virus completo o recombinante) preparado mediante cualquier método descrito aquí.

La invención se relaciona con el uso de un virus monoglucosilado del antígeno de influenza HA (virus completo o recombinante) preparado mediante cualquier método descrito aquí, para la preparación de una vacuna.

Estos y otros aspectos serán evidentes a partir de la siguiente descripción de la modalidad preferida tomada en conjunto con los siguientes dibujos, aunque se pueden efectuar variaciones y modificaciones de las mismas sin apartarse del espíritu y alcance de los conceptos novedosos de la divulgación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Los siguientes dibujos hacen parte de la presente especificación y se incluyen para demostrar adicionalmente determinados aspectos de la presente descripción, cuyas invenciones se pueden entender mejor mediante referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de las modalidades específicas presentadas aquí. La patente o archivo de solicitud contiene por lo menos un dibujo realizado en color. 000014 Se

proporcionarán copias de esta patente o publicación de solicitud de patente con dibujos a color por la Oficina luego de solicitud y pago de la tarifa necesaria.

La FIGURA 1 muestra la preparación de virus 14 NIBRG monoglucosilado. (Figura 1A) El virus se hace crecer en diferente concentración de inhibidor de procesamiento de N-glucosilación, kifunensina. (Figura 1B) El virus glucosilado de alta manosa se digiere a virus monoglucosilado mediante diferentes concentraciones de Endo H. (Figura 1C) Comparado con el virus glucosilado completamente purificado, el virus monoglucosilado purificado tiene un cambio descendente obvio en ambos HA1 y HA2. Estas muestras se analizan mediante análisis Western blot que utiliza un anti- suero de conejo HA anti-H5.

La FIGURA 2 muestra las micrografías electrónicas de virus completamente glucosilados y monoglucosilados. (Figura 2A) NIBRG-14 completamente glucosilado. (Figura 2B) NIBRG-14 monoglucosilado. Las partículas de virus se tiñen con 2% de tungstato de metilamina y se analiza mediante microscopia electrónica de transmisión.

La FIGURA 3 muestra la cuantificación de hemaglutinina. La cantidad de hemaglutinina del virus NIBRG-14 se determina or intensidad de PNGasa F desglucosilada HA1 en SDS-PAGE.

La FIGURA 4 muestra análisis de glucopéptido de hemaglutinina NIBRG-14 monoglucosilada. (Figura 4A) Los sitios de glucosilación de hemaglutinina NIBRG-14 se etiquetan con números de residuos de

000000

aminoácidos. La estructura se crea con código PDB 1j5m, y el sitio de glucosilación se colorea en rojo. (Figura 4B) Análisis de glucopéptido de hemaglutinina NIBRG-14 monoglucosilada. Después de digestión de Endo H, la mayoría de los sitios de glucosilación son monoglucosilados, excepto que los sitios de glucosilación 295 y 489 son todavía parcialmente (<10%) glucosilados ricos en manosa.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los términos utilizados en esta especificación tienen generalmente sus significados habituales en la técnica, dentro del contexto de la invención, y en el contexto específico donde se utiliza cada término. Ciertos términos que se utilizan para describir la invención se discuten adelante, o en otro lugar en la especificación, para proporcionar orientación adicional para el practicante con respecto a la descripción de la invención. Por conveniencia, ciertos términos pueden destacarse, por ejemplo mediante cursiva y/o comillas. El uso de resaltado no tiene influencia en el alcance ni en el significado de un término; el alcance y significado de un término es el mismo, en el mismo contexto, ya sea que se resalte o no. Se apreciará que lo mismo se puede decir en más de una forma.

Por consiguiente, se puede utilizar lenguaje y sinónimos alternativos para uno cualquiera o más de los términos discutidos aquí, ni tienen ningún significado especial para que se le ponga ya sea o no que el término sea discutido o tratado aquí. Se proporcionan sinónimos de ciertos términos. Una mención de uno o más sinónimos no excluye el uso de otros sinónimos. El uso de

000016

ejemplos en cualquier lugar en esta especificación que incluye ejemplos de cualquiera de los términos discutidos aquí es sólo ilustrativo, y de ninguna manera limita el alcance y significado de la invención o de cualquier término ejemplificado. Del mismo modo, la invención no se limita a las diversas formas de modalidades dadas en esta especificación.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por una persona medianamente versada en la técnica a la que pertenece esta invención. En caso de conflicto, el presente documento, que incluye las definiciones lo regirá. Las siguientes referencias proporcionan a un experto una definición general de muchos de los términos utilizados en esta invención: Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd Ed. 1993); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., Cambridge University Press. 1990); The Glossary of Genetics, 5th ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991); y Hale & Margham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991).

Generalmente, las nomenclaturas utilizadas en relación con, y las técnicas de, cultivo de células y tejidos, biología molecular, y proteínas y química de oligo-o polinucleótido e hibridación descritos aquí son aquellas bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica. Se utilizan técnicas estándar para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos, y cultivo y transformación de tejidos (por ejemplo, electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y técnicas de

000017

purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como comúnmente se logran en la técnica o como se describe aquí. La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique específicamente lo contrario, métodos convencionales de virología, inmunología, microbiología, biología molecular y técnicas de ADN recombinante dentro de la experticia de la técnica, muchos de los cuales se describen adelante con el propósito de ilustración. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook, et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989); Maniatis et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982); *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I & II (D. Glover, ed.); *Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait, ed., 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B. Hames & S. Higgins, eds., 1985); *Transcription and Translation* (B. Hames & S. Higgins, eds., 1984); *Animal cell culture* (R. Freshney, ed., 1986); Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984).

Los términos "influenza subtipo A" o "virus de influenza subtipo A" se utilizan de forma intercambiable, y se refieren a variantes del virus de influenza A que se caracterizan por una proteína de superficie vírica de hemaglutinina (H), y así se etiquetan por un número H, tal como, por ejemplo, H1, H3, y H5. Adicionalmente, los subtipos se pueden caracterizar adicionalmente por una proteína de superficie vírica de neuraminidasa (N), indicada por un número N, tal como, por ejemplo, N1 y N2. Como tal, un subtipo se puede denominar por ambos números de N y H, tales como, por ejemplo, H1N1, H5N1, y H5N2. Los términos incluyen específicamente todas las cepas (que incluyen cepas extintas)

000018

dentro de cada subtipo, que generalmente resultan de mutaciones y muestran diferentes perfiles de patógenos. Estas cepas también se conocerán como varios "aislados" de un subtipo vírico, incluyendo todas las cepas pasadas, presentes y futuras.

De acuerdo con lo anterior, en este contexto, los términos "cepa" y "aislado" se utilizan de forma intercambiable. Los subtipos contienen antígenos basados en un virus de influenza A. Los antígenos se pueden basar en una proteína de superficie vírica de hemaglutinina y se puede ser designar como "antígeno HA". En algunos casos, dichos antígenos se basan en la proteína de un subtipo particular, tal como, por ejemplo, un subtipo H1 y un subtipo H5, que puede ser designado un antígeno H1 y un antígeno H5, respectivamente.

Como se utiliza en la presente descripción, el término proteína "desglucosilada" o "parcialmente glucosilada" denota una proteína que tiene uno o más azúcares retirados de la estructura de glucano de un caso completamente glucosilado de la proteína y en la que la proteína retiene sustancialmente su conformación/plegado natural. Una proteína "desglucosilada" incluye una proteína parcialmente glucosilada en la que el proceso de desglucosilación conduce a monoglucosilación, diglucosilación o triglucosilación en uno o más sitios de glucosilación presentes en la glucoproteína.

Una proteína "parcialmente glucosilada" incluye una proteína "desglucosilada" en la que se retienen uno o más azúcares en cada sitio de glucosilación, y cada sitio de glucosilación ~~parcial~~ ^{total} 6019

contiene una estructura de glucano más pequeña (que contiene pocas unidades de azúcar) en comparación con el sitio en un caso totalmente glucosilado de la glucoproteína, y la proteína parcialmente glucosilada retiene sustancialmente su conformación/plegado nativo. Una proteína "parcialmente glucosilada" se genera mediante desglucosilación parcial de la estructura de glucano de por lo menos un sitio de glucosilación de un caso completamente glucosilado de la glucoproteína. Una proteína "parcialmente glucosilada" también se genera al introducir glucosilación en un sitio no glucosilado de una proteína de tal manera que la secuencia de glucosilación agregada es más pequeña que la estructura de glucano en ese sitio en un caso completamente glucosilado de la glucoproteína. Una proteína "parcialmente glucosilada" también se genera al sintetizar una secuencia de glucoproteína vírica, o fragmento de la misma, al introducir unidades de aminoácidos glucosilados (por ejemplo, unidades estructurales de GlcNAc-Arginina) en los sitios de glucosilación de la secuencia, de tal manera que la estructura de glucano agregada es menor que la estructura de glucano en ese sitio en un caso completamente glucosilado de la glucoproteína.

La transmisión vírica comienza con una interacción crítica entre la hemaglutinina (HA) de la glucoproteína, que está en la cubierta vírica de la influenza, y el ácido siálico (SA) que contiene glucanos, que están en la superficie celular del anfitrión. Para dilucidar la función de la glucosilación HA en esta importante interacción, se preparan diversas glucoformas HA definidas, y se estudia su afinidad de unión y especificidad al utilizar una micromatriz SA sintética. El truncamiento de las

000020

estructuras de N-glucano en HA aumenta las afinidades de unión SA, mientras que reduce la especificidad hacia diferentes ligandos SA. Se analiza cuantitativamente la contribución de cada monosacárido y grupo sulfato dentro de las estructuras de ligando SA a energía de unión Ha. Se encuentra que el grupo sulfato agrega casi 100 veces (2.04 kcal/mol) energía de unión a la HA completamente glucosilada, y así el glucano biantenarico a la glucoforma HA monoglucosilada. Los anticuerpos producidos contra la proteína HA que llevan solo un GlcNAc ligado a N en cada sitio de glucosilación muestran mejor afinidad de unión y la actividad de neutralización contra los subtipos de influenza que las HA completamente glucosiladas dilucidadas. Por lo tanto, la eliminación de glucanos estructuralmente no esenciales en las glucoproteínas de superficie vírica es un método muy eficaz y general para el diseño de vacunas contra la influenza y otros virus humanos.

La glucosilación de polipéptidos es típicamente ya sea ligada a N o ligada a O. Ligado a N se refiere a la unión de la unidad estructural de carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Un "sequon" es una secuencia de tres aminoácidos consecutivos de una proteína que puede servir como el sitio de adhesión a un polisacárido (azúcar) denominado un Glucano ligado a N. Este es un polisacárido unido a la proteína a través del átomo de nitrógeno en la cadena lateral de la asparagina (Asn). Un sequon es ya sea Asn-Xaa-Ser o Asn-Thr-Xaa, donde Xaa es cualquier aminoácido excepto prolina. Por lo tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptidos en un polipéptido crea un sitio de glucosilación potencial.

Glucosilación ligada a O se refiere a la adhesión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa a un ácido hidroxiamino, más comúnmente serina o treonina, aunque también se puede utilizar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina. Mientras que el sequon Asn-X-Ser/Thr es absolutamente necesario para la adhesión de oligosacáridos ligados a N a una glucoproteína (Marshall RD, *Biochemical Society Symposia* 40, 17-26 1974), su presencia no siempre resulta en la glucosilación y algunos sequons en las glucoproteínas pueden permanecer no glucosilados. (Curling EM, et al., *Biochemical Journal* 272, 333-337 1990)

Un aspecto de la presente invención es un método para producir glucoproteínas no naturales que tienen estructuras de carbohidrato simplificadas.

De acuerdo con lo anterior el método se puede aplicar a retrovirus tales como VIH, flavivirus tales como hepatitis C, Dengue y Nilo Occidental, y similares.

Aproximadamente la mitad de la masa molecular de gp120, la proteína de la envoltura de unión al receptor del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), consiste de glucanos ligados a N. Casi la mitad de estos glucanos son del tipo ricos en manosa. Estos glucanos ricos en manosa proporcionan un rico bosque de residuos de manosa en la superficie del virus que hace del VIH un objetivo primordial para la interacción con lectinas específicas de manosa del sistema inmune.

000022

Las glucoproteínas de la envoltura del virus de la hepatitis (VHC) son altamente glucosiladas, con generalmente 4 y 11 glucanos ligados a N en E1 y E2, respectivamente. Varios glucanos cumplen una función importante en el montaje y/o infectividad de HCVcc. Por lo menos cinco glucanos en E2 (denotados E2N1, E2N2, E2N4, E2N6 y E2N11) reducen fuertemente la sensibilidad del VHC a la neutralización de anticuerpos. (Helle F et al, J Virol 2010 Nov; 84 (22):11905-1915).

La proteína E de la mayoría de los flavivirus se modifica por glucosilación ligada a Asn en el residuo 153/154 y en el caso de los cuatro serotipos del virus del dengue (DENV) por un segundo glucano en el residuo 67. En el virus del dengue, los glucanos ligados a N en la proteína E son una mezcla de glucanos ricos en manosa y complejo. La envoltura de la proteína del virus del Nilo Occidental (E) contiene un único sitio de glucosilación ligada a N en el residuo 154. Dado que se reduce notablemente la ablación de glucanos en estos sitios, pero no se elimina, la inefectividad, las vacunas objetivadas a los sitios conservados cuando se presentan con glucosilación simplificada pueden conducir a una terapia eficaz, que es menos sensible a las variaciones de mutaciones en el virus.

Inhibidores de Glucosidasa

Las hidrolasas de glucósido (también llamadas glucosidasas o la glucosil hidrolasas) catalizan la hidrólisis del enlace glucosídico para liberar azúcares más pequeños. Son enzimas comunes con funciones en la naturaleza, que incluyen degradación

de la biomasa, tales como celulosa y hemicelulosa, en estrategias de defensa anti-bacterianas (por ejemplo, lisozima), en mecanismos de patogénesis (por ejemplo, neuraminidasas virícas) y en la función celular normal (por ejemplo, recorte de manosidasas involucradas en la biosíntesis de glucoproteínas ligadas a N). Junto con glucosiltransferasas, las glucosidasas forman la maquinaria catalítica principal para la síntesis y la degradación de los enlaces glucosídicos.

Los inhibidores de glucosilación se contemplan para uso de acuerdo con los métodos de la invención. Ejemplos de dichos inhibidores incluyen Kinefusina, Australina, Castanospermina, Desoxinojirimicina, Desoximanojirimicina, Swainsonina, Mannostatina A, y similares.

La Australina es un alcaloide de pirrolizidina polihidroxilada que es un buen inhibidor de la alfa-glucosidasa amiloglucosidasa (inhibición del 50% a 5.8 microM), pero no inhibe la beta-glucosidasa, alfa-o beta-manosidasa, o alfa-o beta-galactosidasa. La castanospermina es un alcaloide indolizina que inhibe las actividades de alfa-glucosidasa y altera la distribución de glucógeno. La castanospermina inhibe la infección por virus del dengue (Whitby et al, J Virol 2005 julio; 79 (14):... 8.698-8706).

La biosíntesis de los diversos tipos de estructuras de oligosacáridos ligados a N implica dos series de reacciones: 1) la formación del precursor de sacárido ligado a lípido, Glc3Man9 (GlcNAc) 2-pirofosforil-dolicol, mediante la adición gradual de GlcNAc, manosa y glucosa a dolicol-P, y 2) la eliminación de la

000024

glucosa y manosa por glucosidasas unidas a la membrana y la adición de GlcNAc, galactosa, ácido siálico, y fucosa por glucosiltransferasas localizadas en el aparato de Golgi para producir diferentes estructuras de oligosacáridos complejos.

El uso de inhibidores que bloquean las reacciones de modificación en diferentes etapas, provocan que la célula produzca glucoproteínas con estructuras de carbohidratos alteradas. Se ha identificado un número de compuestos similares a alcaloides que son inhibidores específicos de las glucosidasas y manosidasas involucradas en el procesamiento de glucoproteína. Estos compuestos provocan la formación de glucoproteínas con estructuras ricas en manosa que contiene glucosa, o varias cadenas de alto contenido en manosa o híbridas, dependiendo del sitio de inhibición. (Elbein AD FASEB J. 1991 diciembre, 5 (15): 3055-3063).

Las primeras cuatro enzimas que funcionan en el procesamiento de glucoproteínas ligadas a Nson glucosidasas. La GlcNAc-fosfotransferasa cataliza la primera etapa en la síntesis del determinante de manosa 6-fosfato. Una estructura de carbohidrato adecuado facilita en gran medida la fosforilación eficiente por GlcNAc-fosfotransferasa. La estructura de carbohidrato acoplada a la fosforilación necesaria para la síntesis de una señal de manosa-6-fosfato en la molécula de GAA es un N-glucano rico en manosa.

Se conocen varios inhibidores de procesamiento de manosidasa. La swainsonina, aislada de marihuana ha demostrado ser un potente

000525

inhibidor de la manosidasa II de Golgi, pero no tiene ningún efecto en manosidasa I (James, LF, Elbein, AD, Molyneux, RJ, y Warren, C.D. (1989) Swainsonine and related inhibitor de glucosidasas. Iowa State Press, Ames, Iowa). La desoximanojirimicina es un inhibidor muy potente de manosidasa I de hígado de rata. En células intactas, la desoximannojinimicina bloquea la síntesis de tipos de complejos de oligosacáridos ligados a N y provoca la acumulación de glucoproteínas que tienen estructuras $\text{Man}_{7-9}(\text{GlcNAc})_2$, con oligosacáridos $\text{Man}_{9-12}(\text{GlcNAc})_2$ predominantes (Elbein, AD, et al. (1984). *Arch Biochem. Biophys.* 235, 579-588). La mannostatina A es un metabolito producido por el microorganismo, *Streptoverticillium verticillus*, y se reporta que este compuesto es un potente inhibidor de la α -manosidasa de epidídimo de rata (Aoyagi, T., et al. (1989) *J. Antibiot* 42, 883-889).

La Kifunensina (Kif) fue aislado por primera vez del actinomiceto, *Kitasatosporia kifunense* No. 9482 (M. Iwami, O. et al. *J. Antibiot.*, 40, 612, 1987) y es un derivado de oxamida cíclico de 1-amino-mannojirimicina. La kifunensina inhibe la enzima manosidasa I del aparato de Golgi de célula animal. Cuando se agrega kifunensina a las células de mamífero en cultivo a concentraciones de 1 $\mu\text{g/ml}$ o más, se produce un cambio completo en la estructura de los oligosacáridos ligados a N de las cadenas complejas a Man_{9-12} las estructuras $(\text{GlcNAc})_2$, de acuerdo con su inhibición de manosidasa I. Por otro lado, la desoximanojirimicina, incluso a 50 $\mu\text{g/ml}$, no impide la formación de todas las cadenas complejas chains (Elbein, A. D., et al. (1990) Kifunensine, a potent inhibitor of the glycoprotein

processing mannosidase I. *J Biol. Chem.* 265, 15599-15605). Por lo tanto, la kifunensina es uno de los inhibidores más eficaces de procesamiento de glucoproteína.

La kifunensina también ha demostrado actividad inmunomoduladora prometedora en la inhibición de α -manosidasa. Se ha reportado la síntesis de kifunensina por Kayakiri, et al, *Tetrahedron Lett.*, 31, 225, 1990; H. Kayakiri, et al., *Chem. Pharm. Bull.*, 39, 1392, 1991) y Hudlicky et al. (J. Rouden y T. Hudlicky, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1095, 1993; J. Rouden, T. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 116, 5099, 1994).

El tratamiento de las células con kifunensina (Kif) resulta en la inhibición del procesamiento de glucoproteína en esas células (Elbein et al (1991) *FASEB JD* (5): 3055-3063, y Bischoff et al (1990) *J. Biol. Chem.* 265 (26): 15.599 a 15.605). La Kif bloquea la adhesión de complejo de azúcar de proteínas modificadas. Sin embargo, si se utiliza suficiente Kif para inhibir completamente el procesamiento glucoproteína de hidrolasas lisosomales, las hidrolasas resultantes tienen estructuras de manosa-9, que no son los sustratos más eficientes para la enzima fosfotransferasa GlcNAc.

De acuerdo con la invención, un inhibidor de glucosidasa tal como Kif, se agrega a las células en la cantidad de por lo menos 0.01 $\mu\text{g/ml}$ a aproximadamente por lo menos 500 $\mu\text{g ml}$, que incluye 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 1.75, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.25, 9.5, 9.75 y todos los valores entre ellos.

000027

La kifunensina inhibe la función de la enzima α -manosidasa I en la ruta de N-glucosilación y resulta en glucoproteínas con composiciones $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$.

Se pueden medir los niveles y/o tipos de estructuras de carbohidratos de complejos utilizando métodos conocidos. Por ejemplo, las glucoproteínas y sus oligosacáridos asociados se pueden caracterizar utilizando endoglucosidasas para diferenciar entre los oligosacáridos ricos en manosa y del tipo de complejos (Maley et al (1989) *Anal. Biochem.* 180:195-204). El péptido- N_4 - (N-acetileno-1- β -glucosaminil) asparagina amidasa (PNGasa F) es capaz de hidrolizar oligosacáridos ligados a asparaginas (ligada a N) en el enlace β -aspartilglucosilamina para producir amoniaco, ácido aspártico y un oligosacárido con una di-N-acetilquitobiosa intacta en el extremo reductor. La especificidad de PNGasa es amplia debido a que los oligosacáridos ricos en manosa, híbridos, di-, tri- y tetraantenarios complejos, sulfatados y polisialolo son sustratos. Adicionalmente, la endo- β -N-acetilglucosaminidasa H (EndoH) hidroliza eficazmente la unidad de quitobiosa en oligosacáridos ligados a N híbridos, que contienen manosa que poseen en tres residuos de manosa, siempre que la ramificación 1,6-manosa tenga otra manosa adherida. Los oligosacáridos complejos son resistentes a digestión con EndoH.

Para caracterizar el tipo de oligosacáridos ligados a N presentes en las glucoproteínas, una alícuota de proteína se puede digerir con PNGasa F (0.5% de SDS, 1% de β -mercaptoetanol, 50 mM de NP-40, 50 mM de Fosfato de Sodio, pH 7.5) o EndoH (0.5% de SDS, 1%

de β -mercaptoetanol, 50 mM de Citrato de Sodio, pH 5.5) bajo condiciones de reducción. Las proteínas naturales y digeridas luego se analizan por electroforesis en poliacrilamida SDS en condiciones de reducción y se comparan las movilidades relativas. Si la glucoproteína contiene sólo oligosacáridos ricos en manosa las muestras tratadas con PNGasaF y EndoH tendrán una mayor movilidad que las de proteína no tratada. La proteína tratada con EndoH tendrá un peso molecular ligeramente más alto debido a la única N-acetilglucosamina restante en cada sitio de glucosilación ligada a N. Si una glucoproteína sólo contiene oligosacáridos complejos, la proteína tratada con EndoH no tendrá un cambio en la migración en comparación con la proteína no tratada. Si hay oligosacáridos complejos y ricos en manosa, entonces, la proteína tratada con EndoH será más pequeña que la glucoproteína no tratada pero más grande que la proteína tratada con PNGasaF. La diferencia será mayor que la que se puede por la N-acetilglucosamina restante.

Para generar los glucanos simplificados sobre las glucoproteínas objetivo, se utilizan endoglucosidasas. Una endoglucosidasa es una enzima que libera oligosacáridos desde glucoproteínas o glucolípidos. O simplemente divide cadenas de polisacáridos entre residuos que no son el residuo terminal, a pesar de que liberan oligosacáridos de la proteína conjugada y moléculas de lípidos que son más comunes. Esto rompe los enlaces glucosídicos entre dos monómeros de azúcar en un polímero. Ejemplos de endoglucosidasas incluyen, pero no se limitan a, endoglucosidasa D, endoglucosidasa F, endoglucosidasa F1, endoglucosidasa F2, endoglucosidasa H, y endoglucosidasa S.

000029

Preparación de virus monoglucosilado de influenza

Para producir proteínas con glucoproteínas ricas en manosa, las células que alojan virus de la influenza se exponen a Kif (y/o DMJ) para inhibir el procesamiento de glucoproteínas. Para producir virus monoglucosilado de influenza, el virus se inyecta en la cavidad alantoidea de huevos de pollo embrionados libres de patógenos con unos inhibidores de manosidasa, tales como kifunensina.

La kifunensina inhibe la función de la enzima α -manosidasa I en la ruta de N-glucosilación y resulta en glucoproteínas con composiciones $\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2$. La concentración de kifunensina en la inhibición de la glucosilación de hemaglutinina varía entre 5, 10, 25, 50, 75, 100, 200, 500 $\mu\text{g/mL}$ y hasta 500 $\mu\text{g/mL}$ y todos los valores entre los mismos.

Después de alrededor de 1 a 3 días de incubación, se cosecha la kifunensina tratada fluido alantoideos y se digiere con endoglucosidasa (Endo H) para eliminar los glucanos de tipo ricos en manosa, es decir, concentraciones capaces de convertirse desde $\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2$ hasta solo GlcNAc. La concentración de Endo H en el fluido alantoideo para producir hemaglutinina mono-glucosilada varía por lo menos de aproximadamente aproximadamente 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 7, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 75, 100, 150, 200, 500 o más $\mu\text{g/mL}$ de fluido alantoideo. Posteriormente, se recupera y purifica el virus monoglucosilado.

000030

Uso de virus monoglucosilado de influenza

Se pueden utilizar los antígenos del virus monoglucosilado de influenza aquí descritos para inmunizar contra la infección por virus de la influenza. El virus específico del que se derivan los antígenos puede ser el mismo o diferente del virus específico para el que se está proporcionando la protección, debido a que se sabe que ocurre protección cruzada entre diferentes aislados con los virus de influenza, en particular dentro de los mismos subtipos víricos.

La vacuna contra la influenza actualmente en uso se designan vacuna o subvirión (SV) de virus completo (WV) (también denominado "división" o "antígeno de superficie purificado"). La vacuna WV contiene virus inactivado, intacto, mientras que la vacuna SV contiene virus purificado interrumpido con detergentes que solubilizan la envoltura vírica que contiene lípidos, seguido por la inactivación química de los virus residuales. También se encuentran en desarrollo vacunas víricas atenuadas contra la influenza. Una discusión de los métodos de preparación de vacuna convencional se puede encontrar en Wright, P. F. & Webster, R. G., *FIELDS VIROLOGY*, 4d Ed. (Knipe, D. M. et al. Ed.), 1464-65 (2001).

Cuando una vacuna incluye más de una cepa de influenza, las diferentes cepas se cultivan típicamente por separado y se mezclan después de que se han cosechado los virus y se han preparado los antígenos. Alternativamente, se pueden combinar

000531

diferentes segmentos de diferentes aislados de virus de la influenza para generar una vacuna multipotente. El virus de la influenza (es) utilizado en los procesos de la invención pueden ser cepas reordenadas, y/o se pueden haber obtenido mediante técnicas de genética inversa. Se puede atenuar el virus (s). El virus (s) puede ser sensible a la temperatura. El virus (s) se puede adaptar al frío. Una cepa reordenada que incluye segmentos víricos HA y/o NA de una cepa patógena y se pueden utilizar los restantes seis o siete segmentos de una cepa no patógena.

El antígeno devirus de la influenza utilizado en la composición inmunogénica de acuerdo con la invención puede estar en la forma de un virus vivo o, preferiblemente, un virus inactivado. La inactivación del virus típicamente involucra el tratamiento con un producto químico tal como formalina o β -propiolactona. Cuando se utiliza un virus inactivado, el antígeno puede ser un virus completo, un virus dividido, o subunidades víricas. Los virus divididos se obtienen al tratar viriones con detergentes (por ejemplo, éter de etilo, polisorbato 80, desoxicolato, fosfato de tri-N-butilo, Triton X-100, Tritón N 101, bromuro de cetiltrimetilamonio, etc.) para producir preparaciones de subviriones. Las vacunas de subunidades comprenden uno o ambos antígenos de hemaglutinina y neuraminidasa de superficie de influenza. También se pueden preparar antígenos de influenza en la forma de virosomas.

Cuando se prepara un antígeno a partir de un virus de la influenza (es decir, en lugar de haber sido producido en un sistema recombinante o sintético que no involucre el crecimiento

000032

de virus de la influenza), se puede cultivar el virus ya sea en cultivos de huevos o células. El crecimiento en los huevos embrionados libres de patógeno específico es la ruta tradicional por la cual se han cultivado los virus de influenza para la producción de vacuna, y el cultivo de células es un desarrollo más reciente. Cuando se utiliza cultivo de células luego, normalmente se cultivará el virus de vacuna contra la influenza en células de mamíferos, tales como células MDCK, células Vero o células PER.C6. Estas estirpes celulares están ampliamente disponibles por ejemplo, de la colección American Cell Culture Type (ATCC), o Coriell Cell Repositories (Camden, NJ). Por ejemplo, la ATCC suministra varias células Vero diferentes bajo los números de Catálogo de CCL-81, CCL-81.2, el CRL-186 y la CRL-1587, y que suministra las células MDCK bajo número de catálogo CCL-34. También es posible el crecimiento de estirpes celulares aviares, que incluyen estirpes celulares derivadas de gallina, por ejemplo, fibroblastos de embrión de pollo (CEF).

Del mismo modo, un virus (tal como el VIH, HCV, virus de dengue, virus de la influenza, flavivirus y similares) se puede hacer crecer en cultivos celulares en la presencia de uno o más inhibidores de la de glucosidasa (tales como Kinefusina, Australina, castanospermina, desoxinojirimicina, desoximanojirimicina, Swainsonina, manostatina A, y similares). Los sistemas de cultivo de celulares para el crecimiento de estos virus son bien conocidos en la técnica. El virus del Nilo Occidental se puede cultivar en células epiteliales del riñón de mono o cultivos de tejido celular de embrión de pollo. El VIH se puede cultivar en cultivos de células mononucleares de sangre

periférica (PBMC). Se puede cultivar el HC en células derivadas de estirpe celular de hepatoma humano Huh-7.

Las composiciones inmunogénicas y de medicamento de la invención son adecuadas para la administración a un paciente. Esto se puede lograr mediante varias maneras, que incluyen pero no se limitan a: inyección intradérmica; administración transdérmica; y administración tópica. Estas se pueden utilizar en conjunto con abrasión de la piel por ejemplo, por papel de lija o por el uso de microabrasivos. Las composiciones inmunogénicas y de medicamento de la invención se presentan preferiblemente como vacunas.

Las composiciones de la invención pueden incluir un adyuvante. Los adyuvantes que se han utilizado en vacunas contra la influenza incluyen sales de aluminio, quitosano, oligodesoxinucleótidos CpG tal como CpG 7909, emulsiones de aceite-en-agua, tales como MF59, emulsiones de agua-en-aceite-en-agua, E. coli, toxina lábil al calor y sus mutantes desintoxicadas, monofosforil lípido A y su derivado 3-O-desacilado, mutantes de toxina pertussis, dipéptidos de muramilo, etc.

EJEMPLOS

Sin intención de limitar el alcance de la invención, se proporcionan adelante los instrumentos, aparatos, métodos de ejemplo y sus resultados relacionados de acuerdo con las modalidades de la presente invención. Tenga en cuenta que se pueden utilizar títulos o subtítulos en los ejemplos para la

000034

comodidad de un lector, que de ningún modo deben limitar el alcance de la invención. Más aún, se proponen ciertas teorías y se describen aquí, sin embargo, de ninguna manera, ya sean correctas o incorrectas, deben limitar el alcance de la invención siempre y cuando la invención se practique de acuerdo con la invención sin tener en cuenta ninguna teoría o esquema particular de la acción.

EJEMPLO 1: Preparación de los virus completamente glucosilados y monoglucosilados

El virus de influenza A, NIBRG-14 (H5N1) (Nicolson C, et al. (2005) *Vaccine* 23(22):2943- 2952), se inyecta (1000 TCID₅₀ (50% de Dosis Infectada con cultivo de Tejido) en 200 µl de PBS) en la cavidad alantoica de huevo de pollo embrionado libre de patógeno específico (SPF) de 10 días para producir el virus completamente glucosilado ordinario (WHO (2005) *manual WHO sobre el diagnóstico y la supervivencia de influenza en animales*. (Organización Mundial de la Salud, Génova)).

Para producir virus monoglucosilado, el virus se inyecta en la cavidad alantoica con 0.2 mg/ml de kifunensina (Cayman Chemical). La kifunensina inhibe la función de la enzima α -mannosidasa I en la ruta de N-glucosilación y resulta en glucoproteínas con composiciones Man₉GlcNAc₂ (Elbein AD, et al. (1990) *J Biol Chem* 265(26):15599-15605).

Se analiza la dependencia de concentración de la kifunensina para inhibir la glucosilación de hemaglutinina (Figura 1A). Después de

000335

3 días de incubación se cosecha el fluido alantoico y se centrifuga para eliminar los desechos durante 10 min a 3,000 g. El fluido alantoico tratado con kifunensina luego se digiere con endoglucosidasa Endo H (20 μ por ml de fluido alantoico) durante 12 horas a 4° C para eliminar los glucanos del tipo ricos en manosa, es decir, desde Man9GlcNAc2 hasta GlcNAc único. Se analiza la dependencia de concentración de Endo H en el fluido alantoico para producir hemaglutinina monoglucosilada (Figura 1B).

Posteriormente, el virus monoglucosilado se sedimenta por ultracentrifugación durante 90 min a 46,000 g, se resuspende con PBS y se purifica mediante un gradiente de densidad de sacarosa discontinuo (25%, 40%) durante 90 min a 270,000 g. El virus en el gradiente se recolecta y sedimenta mediante ultracentrifugación durante 90 min a 120,000 g. Por último, el sedimento se resuspende en PBS y se filtra mediante un filtro de 0.22 μ m (CDC (1982) *Concepts and Procedures for Laboratory-based Influenza Surveillance* (Departamento Estadounidense de Salud y Servicios Humanos, Washington, DC); Harvey R, et al. (2008) *Vaccine* 26(51):6550-6554). Comparado con el virus glucosilado completamente purificado, el virus monoglucosilado purificado tiene obvios cambios descendentes en ambos HA1 y HA2 (Figura 1C).

EJEMPLO 2: Análisis de microscopia electrónica de los virus completamente glucosilados y monoglucosilados

Se coloca la solución del virus sobre la superficie recubierta de colodión carbono de una rejilla de cobre (Electron Microscopy

000036

Sciences). Se elimina el fluido en exceso con papel de filtro, y se agrega 2% de tungstato de metilamina (Ted Pella, Inc.) para teñir durante 30 sec. Se elimina el fluido en exceso con papel filtro, y se lava con H₂O durante 30 sec. Luego, la rejilla se seca al aire durante 4 horas y se fotografían las partículas de virus mediante microscopia electrónica de transmisión (Hitachi H-7000). Los virus NIBRG-14 de influenza monoglucosilados y completamente glucosilados son similares en tamaño y morfología (Figura 2).

EJEMPLO 3: Cuantificación de hemaglutinina en el virus

El virus se mezcla con regulador desnaturalizado (5% de SDS y 10% de β -mercaptoetanol) y se hierve durante 10 min, luego se agrega a la muestra 10% de NP-40 y se trata con PNGasa F (New England Biolabs) a 25° C durante la noche. La muestra se mezcla con regulador de muestra SDS-PAGE y se calienta a 95° C durante 10 min antes de cargar en el gel. El gel se tiñe con SYPRO RUBY® (Invitrogen) y se analiza por el sistema de formación de imágenes VERSA DOC® (Bio-Rad). El tratamiento de la PNGasa F antes del análisis por SDS-PAGE es para separar el HA1 de la proteína NP en la muestra de virus completamente glucosilada. Esto permite la comparación de intensidad directa de proteínas HA1 de ambos virus completamente glucosilados y monoglucosilados en SDS-PAGE para cuantificación de hemaglutinina en el virus (Fig. 3).

Ejemplo 4: análisis de glucopéptidos con LC-MS-MS

000037

Se utiliza espectrometría de masas para analizar la composición de glucano del virus de monoglucosilado. La solución de virus se mezcla con regulador de muestra no reductor y se calienta a 95° C durante 10 min. Antes de cargar en el gel. El gel se tiñe con azul Coomassie. La banda HA0 se corta en piezas pequeñaa para la digestión triptica en gel con tripsina. Después de la digestión, la muestra se analiza mediante LC-MS-MS (Wu Y, et al. (2010) *Rapid Commun Mass Spectrom* 24 (7): 965-972) (Agilent Technologies, Thermo Scientific). Hay seis sitios de N-glucosilación del virus de influenza NIBRG-14. Excepto para pequeños porcentajes de presencia de glucanos de tipo rico en manosa en el residuo 295 (~10% Man₆(GlcNAc)₂) y residuo 489 (~10% Man₇₋₉(GlcNAc)₂), todos los otros glucanos son monoglucosilados con residuo de sacárido GlcNAc único adherido (Fig. 4).

Todas las publicaciones y solicitudes de patente citadas en esta especificación se incorporan mediante referencia como si cada publicación individual o solicitud de patente se indicara específica e individualmente para ser incorporada por referencia.

Aunque la anterior invención se ha descrito con algún detalle a modo de ilustración y ejemplo para propósitos de claridad de comprensión, será fácilmente evidente para los expertos en la técnica a la luz de las enseñanzas de esta invención que se pueden hacer ciertos cambios y modificaciones a la misma sin apartarse del espíritu o alcance de las reivindicaciones adjuntas.

000338

REIVINDICACIONES

Lo que se reivindica es:

1. Un método para producir virus monoglucosilado de influenza, el método comprende:
 - a) hacer crecer un antígeno de hemaglutinina del virus de la influenza (HA) en un anfitrión adecuado con una cantidad efectiva de un inhibidor de mannosidasa, en donde la concentración del inhibidor de mannosidasa es suficiente para inhibir α -mannosidasa I en la ruta de N-glucosilación, y
 - b) recuperar el virus de antígeno de influenza HA y ponerlo en contacto con endoglucosidasa (Endo H), en donde la concentración de Endo H es suficiente para eliminar glucanos del tipo ricos en manosa; y
 - c) aislar un antígeno del virus monoglucosilado de la influenza HA.
2. El método de la reivindicación 1, en donde el antígeno HA se deriva de un virus de la influenza H5N1 altamente patogénico.
3. El método de la reivindicación 2, en donde el virus de la influenza H5N1 altamente patogénico es NIBRG-14.
4. El método de la reivindicación 1, en donde el inhibidor de mannosidasa es kifunensina (Kif).

000039

5. El método de la reivindicación 1, en donde el inhibidor de mannosidasa es desoximannojirimicina (DMJ).
6. El método de la reivindicación 1, en donde el antígeno de influenza HA se produce de forma recombinante en un cultivo celular.
7. El método de la reivindicación 7, en donde el cultivo celular comprende células MDCK, células Vero o células Vero PER.C6.
8. El método de la reivindicación 1, en donde la inhibición de α -mannosidasa I resulta en glucoproteínas con $\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2$.
9. El método de la reivindicación 1, en donde el antígeno de influenza HA comprende un virus completo de la influenza.
10. El método de la reivindicación 9, en donde el virus completo de la influenza se hace crecer en un anfitrión de huevo de pollo embrionado libre de patógeno específico (SPF).
11. El método de la reivindicación 10, en donde la kifunensina se agrega a la cavidad alantoica del huevo de pollo embrionado libre de patógeno específico (SPF).
12. El método de la reivindicación 6, en donde la kifunensina se agrega a la célula anfitriona que aloja un antígeno de influenza HA recombinante.

006040

13. El método de la reivindicación 11 o 12, en donde la kifunensina se agrega a una concentración de 0.005 a 0.5 mg/ml.
14. El método de la reivindicación 6, en donde recuperar el antígeno de influenza HA comprende aislar el antígeno de influenza HA producido de forma recombinante desde la célula anfitriona.
15. El método de la reivindicación 10, en donde recuperar el antígeno de influenza HA comprende:

incubar durante un tiempo suficiente para hacer crecer el virus de influenza; y luego aislar el fluido alantoico que comprende el virus de influenza.
16. El método de las reivindicaciones 14 o 15, en donde el virus recuperado del antígeno de influenza HA se trata con aproximadamente 0.1 a aproximadamente 100 µg/mL de Endo H.
17. El método de la reivindicación 15, en donde el virus monoglucosilado de la influenza se aísla mediante un método que comprende ultracentrifugación de gradiente de densidad.
18. El método de la reivindicación 1, comprende adicionalmente purificar el virus monoglucosilado del antígeno de influenza HA mediante un método que comprende ultrafiltración.
19. El método de la reivindicación 18, en donde la ultrafiltración comprende el uso de un filtro de 0.2 µm.

000041

20. El método de la reivindicación 1, comprende adicionalmente analizar el virus monoglucosilado de la influenza mediante microscopía electrónica.
21. El método de la reivindicación 1, comprende adicionalmente cuantificar el virus monoglucosilado de la influenza mediante un método que comprende tratamiento con PNGasa.
22. El método de la reivindicación 1, comprende adicionalmente cuantificar el virus monoglucosilado de la influenza mediante un método que comprende electrocroatografía SDS-PAGE
23. El método de la reivindicación 1, comprende adicionalmente analizar la composición de glucano del virus monoglucosilado aislado de la influenza mediante un método que comprende espectrometría de masa.
24. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-23, en donde el virus de antígeno de influenza HA se selecciona del grupo que consiste de virus monoglucosilado de la influenza H1, H3, y H5 glucoproteína.
25. Un virus monoglucosilado del antígeno de influenza HA (virus completo o recombinante) preparado mediante cualquier método de acuerdo con las reivindicaciones 1-24.

000042

26. Uso de un virus monoglucosilado del antígeno de influenza HA (virus completo o recombinante) preparado mediante cualquier método de acuerdo con las reivindicaciones 1-24, para la preparación de una vacuna.
27. Un método para producir un virus con un glucano simplificado, el método comprende:
- a) hacer crecer un antígeno a partir de un virus en un anfitrión adecuado con una cantidad efectiva de un inhibidor de glucosilación, en donde la concentración del inhibidor de glucosilación es suficiente para inhibir una glucosidasa en la ruta de N-glucosilación, y
 - b) recuperar el antígeno vírico y ponerlo en contacto con una endoglucosidasa; y
 - c) aislar el antígeno vírico con el glicano simplificado.
28. El método de la reivindicación 27, en donde el virus se selecciona de un ortomixovirus, un retrovirus y un flavivirus.
29. El método de la reivindicación 27, en donde el virus se selecciona de VIH, HCV, virus de dengue, virus del Nilo Occidental y virus de la influenza.
30. El método de la reivindicación 27, en donde el inhibidor de glucosidasa se selecciona de Kinefusina, Australina, Castanospermina, Desoxinojirimicina, Desoximannojirimicina, Swainsonina, y Mannostatina A.

000043

31. El método de la reivindicación 27, en donde el antígeno vírico se produce de forma recombinante en un cultivo celular.
32. El método de la reivindicación 31, en donde el antígeno vírico comprende un virus completo.
33. El método de la reivindicación 32, en donde el virus completo se hace crecer en un cultivo celular.
34. El método de la reivindicación 27, en donde el glucano simplificado es un monoglucosilato.

000044

MÉTODOS PARA PRODUCIR PARTÍCULAS DE VIRUS CON GLUCOSILACIÓN
SIMPLIFICADA DE PROTEÍNAS DE SUPERFICIE

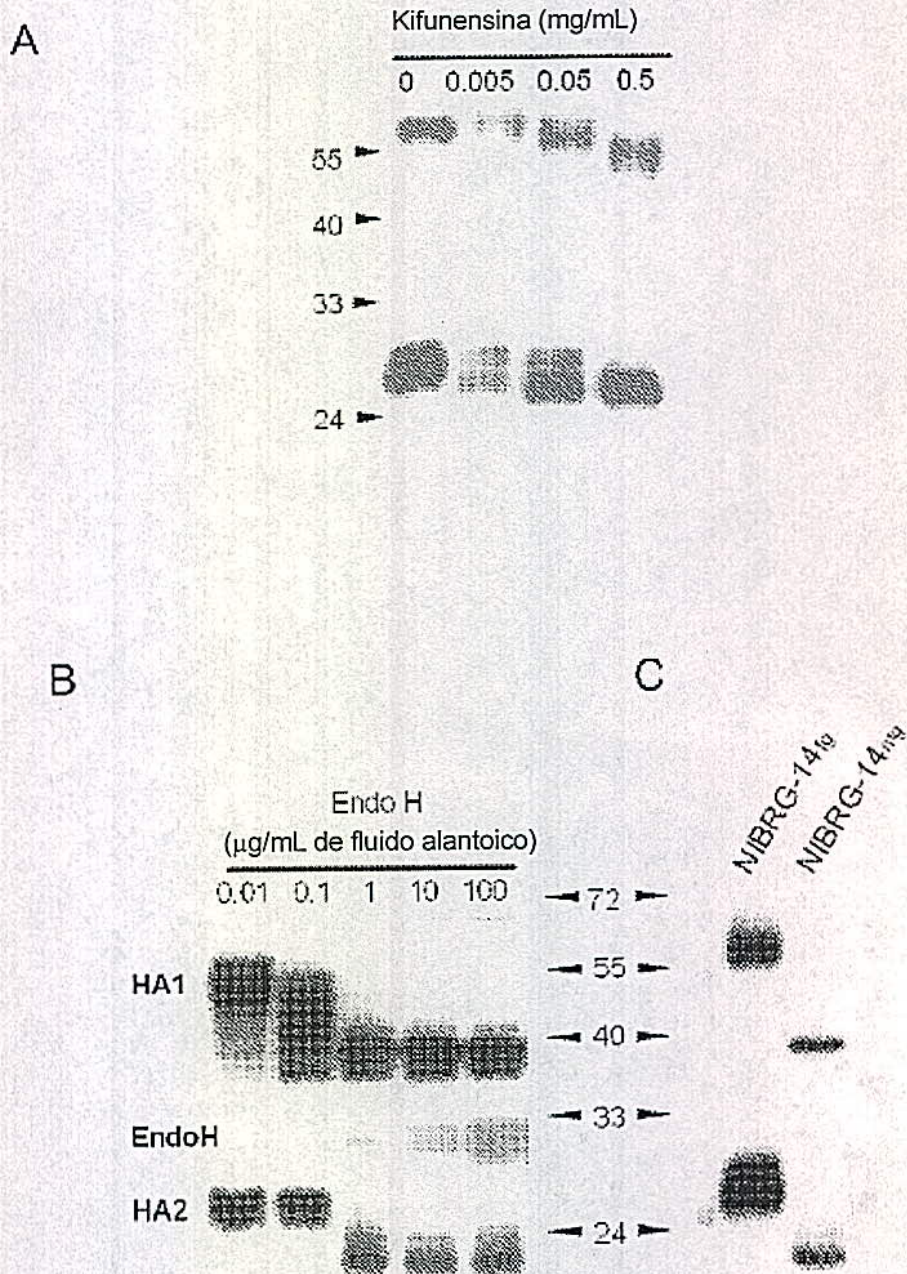
RESUMEN

Se proporcionan métodos para producción de partículas de virus con glucosilación simplificada en proteínas estructurales o de superficie. Cuando se utilizan como objetivos para producción de vacunas, la naturaleza conservada de dichos sitios genera vacunas que son más sensibles a mutaciones víricas. Se describe el uso de inhibidores de glucosilación para producción de virus con perfiles de glucosilación simplificados. Se proporciona una descripción de ejemplo de los virus de la influenza y métodos para producción de partículas de virus de influenza monoglucosilada. Se proporcionan métodos para producción de formas monoglucosiladas de virus de influenza A, NIBRG-14 (H5N1).

000045

1/4

FIGURA 1



000046

FIGURA 2

A

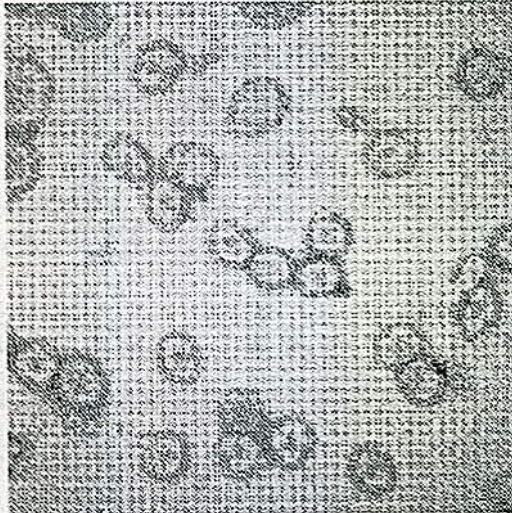
NIBRG-14_{tg}

Fig. 10a-11.jpg
100.0um
Pixel Size: 15.625um x 15.625um
100.0um
15.625um
15.625um

B

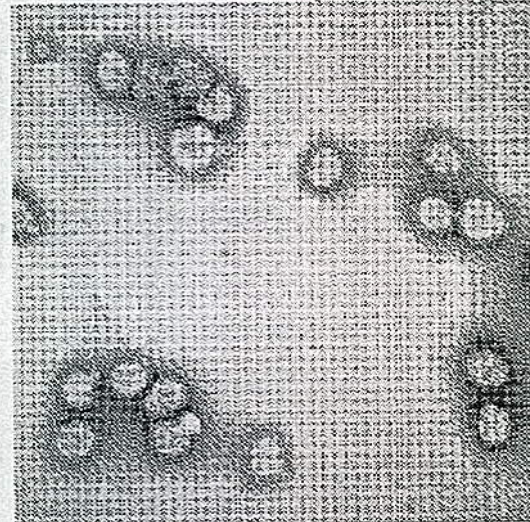
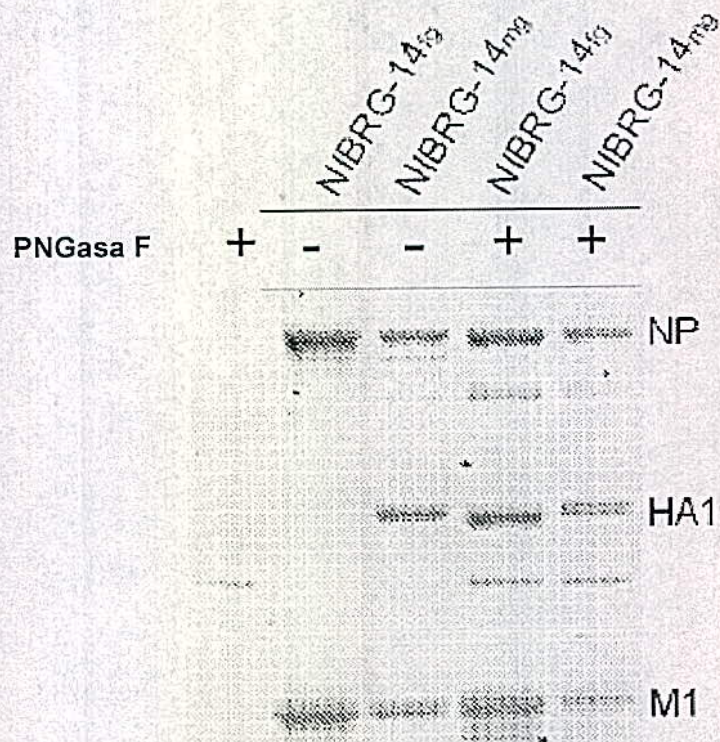
NIBRG-14_{mg}

Fig. 10a-12.jpg
100.0um
Pixel Size: 15.625um x 15.625um
100.0um
15.625um
15.625um

000047

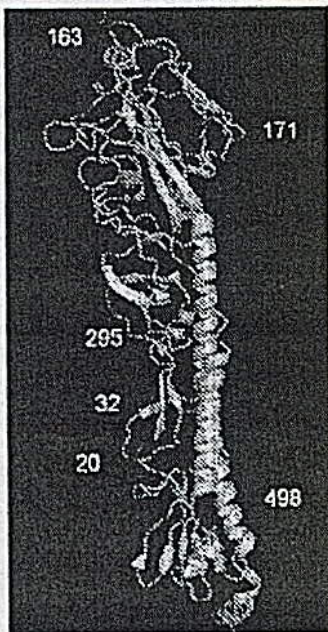
FIGURA 3



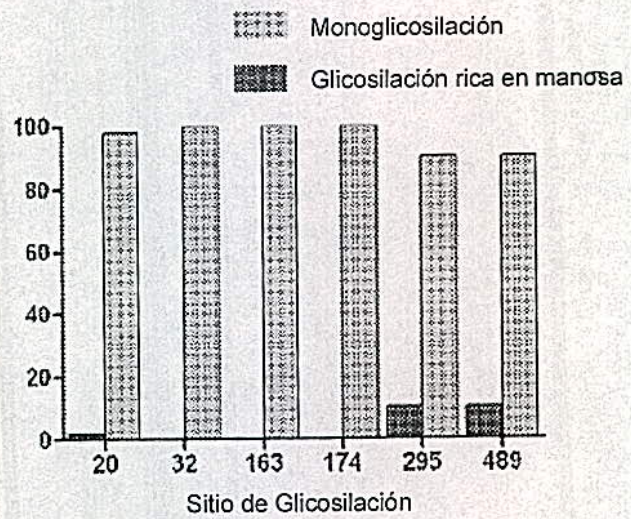
000348

FIGURA 4

A



B



000049



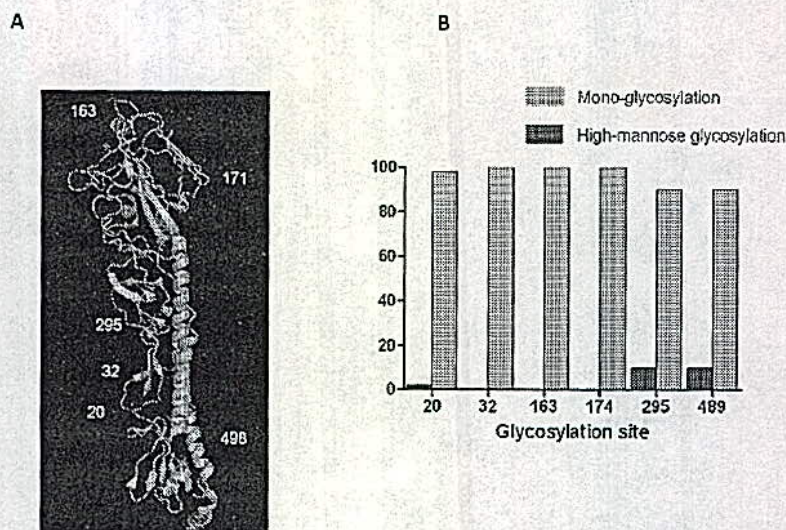
- (51) International Patent Classification:
C12P 21/06 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/US2011/059449
- (22) International Filing Date:
4 November 2011 (04.11.2011)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
61/410,257 4 November 2010 (04.11.2010) US
- (71) Applicant (for all designated States except US):
ACADEMIA SINICA [CN/CN]; 128 Academia Road,
Section 2 Nankang, Taipei 11529 (TW).
- (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 [CN/CN]; 15F, #54 Dongshi
Street, Xizhi Dist., New Taipei City 221 (TW). TSENG,
Yung-Chieh [CN/CN]; 5F., #138, Yongli Rd., Yonghe
Dist., New Taipei City 234 (TW).
- (74) Agent: BASU, Shantanu; Eckman Basu LLP, 2225 E
Bayshore Road, Suite 200, Palo Alto, CA 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, QA, RO, RS, RU,
RW, 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, RW, SD, SL, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD,
RU, TJ, TM), European (AL, 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, RS,
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:

[Continued on next page]

(54) Title: METHODS FOR PRODUCING VIRUS PARTICLES WITH SIMPLIFIED GLYCOSYLATION OF SURFACE PROTEINS

FIGURE 4



(57) Abstract: Methods for production of virus particles with simplified glycosylation on structural or surface proteins are provided. When used as targets for vaccine production, the conserved nature of such sites generates vaccines that are less sensitive to viral mutations. Use of glycosylation inhibitors for production of viruses with simplified glycosylation profiles are disclosed. An exemplary disclosure of influenza viruses and methods for production of mono-glycosylated influenza virus particles is provided. Methods for production of mono-glycosylated forms of influenza A virus, NIBRG-14 (H5N1) are provided.



- 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))

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))

000051

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

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 0040837
		Bogotá D.C., Abril 30 de 2013 - 15:12:00

RECIBIDO DE : CLARKE MODET NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	155835514	30/04/2013	49.905.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	500.000.00 500.000.00
			===== \$500.000.00 =====

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

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

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-111806- -00000-0000

Fecha: 2013-05-03 16:17:19 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 63

000052

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0041538

Bogotá D.C., Mayo 03 de 2013 - 09:37:12

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 83.008.643

R

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	999999999	26742	25/03/2011		728.000.00
RECIBO DE CA	999999999	40866	30/04/2013		450.000.00
RECIBO DE CA	999999999	40938	30/04/2013		125.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO

CONCEPTO

Vr.UNDITARIO

Vr.CONCEPTO

24 50005-01-01 SOLICITUDES

1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA
ADICIONAL A LAS 10 INIC

30.000.00

720.000.00

\$720.000.00

SON: **SETECIENTOS VEINTE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-111806-00000-0000

Fecha: 2013-05-03 16:17:19

Tra. 11 PATENTEIYII

Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Eve: 378 FASENACIONALI

Folios: 53

000053

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

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

Mayo 3 de 2013 - 09:37:13



No. 13-111806- -00000-0000

Fecha: 2013-05-03 16:17:19 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 53

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE

☐	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 ☐