



(31)

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Organización CSA Ltda

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creciones



SOLICITUD PATENTE DE INVENCION

1. EXPEDIENTE No. 08-23024

4. TÍTULO VIRUS DE INFLUENZA MODIFICADO PARA CONTROL Y MEJORAMIENTO DE LA EFICACIA DE LA VACUNA

5. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

7. SOLICITANTE ST. JUDE CHILDRENS RESEARCH HOSPITAL

DOMICILIO MEMPHIS, TENNESSEE, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO EMILIO FERRERO
C.C. 438.019 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C., _____

**Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-023024- -00000-0000

Fecha: 2008-03-04 16:34:37 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONAL
Act. 411 PRESENTACION Folios: 163**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT****ENTRADA EN FASE NACIONAL**

4 Marzo 2008

SOLICITUD DE:

1

☒ Patente de Invención.☐ Patente de Modelo de Utilidad.☒ Capítulo I.☐ Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**Nombre: **ST. JUDE CHILDREN'S
RESEARCH HOSPITAL**
sociedad constituida y existente bajo las
leyes del Estado de Tennessee, Estados
Unidos de América.Dirección: 332 North Lauderdale Street,
Memphis,
Tennessee 38105-2794,
Estados Unidos de AméricaDomicilio: Memphis,
Tennessee,
Estados Unidos de América**IDENTIFICACIÓN**

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO**Nombre: **EMILIO FERRERO**
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@cavelier.com
Domicilio: Bogotá, Colombia.**IDENTIFICACIÓN**

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número 438.019 T.P 31.929

4

**INVENTOR (ES)
(72)**1. **Erich HOFFMANN**
1061 Natchez Point #179,
Memphis,
Tennessee 38103,
Estados Unidos de América3. **Robert G. WEBSTER**
295 Richbriar Street,
Memphis,
Tennessee 38120,
Estados Unidos de América5. **Elena A. GOVORKOVA**
7591 Dexter Hills Drive,
Cordova,
Tennessee 38016,
Estados Unidos de América2. **Aleksandr S. LIPATOV**
1309 Greenbrook Bend, Apt. 8,
Bartlett,
Tennessee 38134,
Estados Unidos de América4. **Richard J. WEBBY**
233 N. McNeil St.,
Memphis,
Tennessee 38112,
Estados Unidos de América

5

PCT (86)Solicitud Internacional No. PCT/US2006/029575Fecha: 28 de julio de 2006Publicación Internacional No. WO 2007/019094 A2Fecha: 15 de febrero de 2007

6

Título (54)**VIRUS DE INFLUENZA MODIFICADO PARA CONTROL Y MEJORAMIENTO DE LA
EFICACIA DE LA VACUNA**

7

Clasificación Internacional (51) A61K 039/145

2

8 Prioridad	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
	SI ☒ NO ☐	<u>US</u>	<u>4 de agosto de 2005</u>

9

Comprobante de pago No.: 08-11,299 Fecha: 11 de febrero de 2008

10

Anexos:

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 501.000.oo.

☐

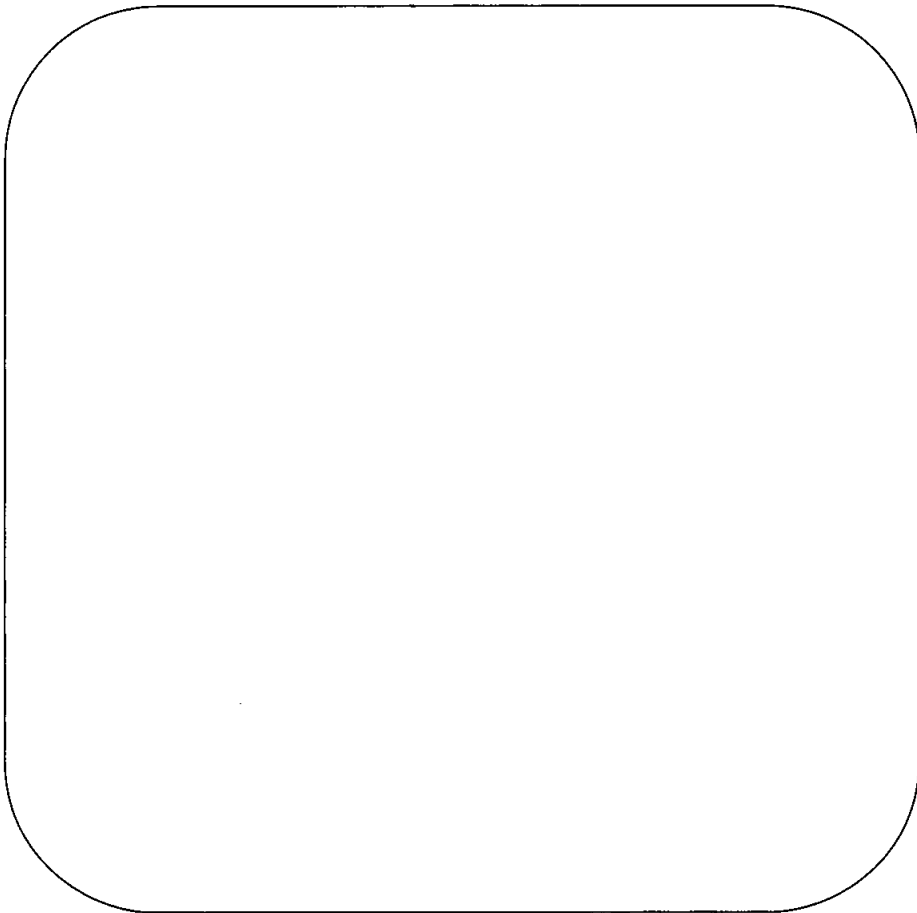
Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.

☐

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.☒☒☐☒☒☐☐☐☐☐☐☐☒

11

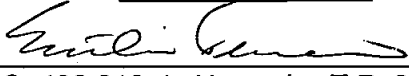
FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: EMILIO FERRERO

FIRMA : 
C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929



DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2007/019094 A2

Descripción:

Páginas 42 en el idioma original

Páginas 66 en español

Reivindicaciones: Número (s) 37

Figuras: Número (s) 3

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ Extracto de publicación.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA
FASE INTERNACIONAL**

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

- 1. Country: United States of America
- 2. This public document has been signed by DEBBIE STAMSON
- 3. acting in the capacity of COUNTY CLERK OF SHELBY COUNTY, TENNESSEE
- 4. bears the seal/stamp of COUNTY SEAL OF SHELBY COUNTY, TENNESSEE

Certified

- 5. at Nashville, Tennessee
- 6. the Monday, February 04, 2008
- 7. by RILEY C. DARNELL, SECRETARY OF STATE, STATE OF TENNESSEE
- 8. No. 08-1254



10. Signature

Riley C. Darnell
al



CAVELIER
ABOGADOS
 EDIFICIO SISKI
 CARRERA 4a N° 72-35
 BOGOTÁ 8 - COLOMBIA

181

Representación y Poder con autenticación notarial y Apostille para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñanzas nombres de dominio, lemas comerciales, licencias.

Representation and Power-of-Attorney with notarial authentication and Apostille for patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, domain names, slogans, licenses.

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER-OF-ATTORNEY

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

ST. JUDE CHILDREN'S RESEARCH HOSPITAL

domiciliado (s) en/of :

332 North Lauderdale Street,
 Memphis, Tennessee 38105-2794
 United States of America

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 y DANIEL PEÑA, tpa. 65.620, domiciliados en la Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso. Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñanzas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del

in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31929; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and DANIEL PEÑA, tpa. 65620, domiciled at Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact of its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time. In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys at law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property, and against the unfair competition for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative-contencioso and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition.

consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this 28-01-2008

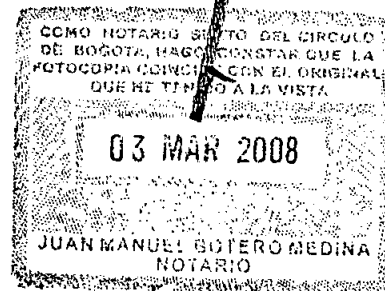
en/in

J. SCOTT ELMER
DIRECTOR, OFFICE OF
TECHNOLOGY LICENSING

por/by

Firma/Signature

J. Scott Elmer



STATE OF TENNESSEE }
SHELBY COUNTY } ss.
CLERK'S OFFICE }

DEBBIE STAMSON, Clerk of said County do hereby certify that

REGINA D. MCKINNEY

before whom the annexed instrument was taken, and whose name is subscribed in the certificate of proof thereof, was, at the time of taking the same, a Notary Public in and for said county, duly sworn and acting as such, and authorized to take the same, and was also authorized to take acknowledgments to deeds or conveyances of land within the state aforesaid; and further, that I am well acquainted with his handwriting, and verily believe the signature thereto to be his genuine signature; and further, that the annexed instrument is executed and acknowledged according to the laws of the State of Tennessee.

In testimony whereof, I have hereunto set my hand and affixed the seal of said County, at Memphis, Tennessee, this

31ST

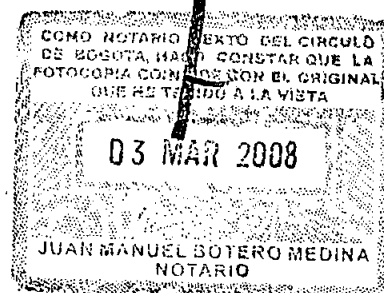
day of

JANUARY

20 08

Debbie Stamson Clerk.

FORMS CONTROL S-802026-T



--- NOTARIO PÚBLICO O FUNCIONARIO AUTORIZADO --- NOTARY PUBLIC OR ATTESTING OFFICIAL ---

CERTIFICACIÓN NOTARIAL (SOCIEDAD)

A los _____ días del mes de _____
de 200 _____ compareció(eron) ante mí,

Quien(es) conozco personalmente y que firma(n) este documento en
representación de la Sociedad/compañía denominada _____

Certifico:

1. Que he visto los siguientes documentos:*

2. Que dichos documentos prueban lo siguiente:

2.1. Que es una Sociedad/Compañía

legalmente constituida y existente de acuerdo con las leyes del
Estado de _____

2.2. Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es _____

2.3. Que el objeto u objetos para los cuales se otorga el presente
poder están comprendidos dentro del objeto social de la
mencionada Sociedad/Compañía.

2.4. Que el(los) Sr.(Sres.) _____

está(n) autorizado(s) para otorgar el presente Poder.

Ciudad _____

Estado _____

Hoy _____ de 200 _____

NOTARIAL CERTIFICATION (CORPORATION)

On this 28 day of January
2008 appeared before me

Regina D. McKinney
who(m) I know personally and who(m) signed this document as
representative(s) of the Corporation/Company named

James Scott Elmer

I certify:

1. That I have seen the following documents:*

Tennessee Driver's License
St. Jude Identification

2. That the above documents duly prove the following:

2.1. That ST. JUDE CHILDREN'S RESEARCH HOSPITAL is
a Corporation/Company legally
constituted and in existence in accordance with the laws of the
State of Tennessee, United States of America

2.2. That the domicile of said Corporation/Company is

332 North Lauderdale Street,
Memphis, Tennessee 38105-2794
United States of America

2.3. That the purpose or purposes for which the present Power of
Attorney is granted are comprised within the corporation purposes set
forth in the charter of the mentioned Corporation/Company.

2.4. That Mr.(Messrs.) _____

is(are) authorized to grant the present Power of Attorney

City Memphis

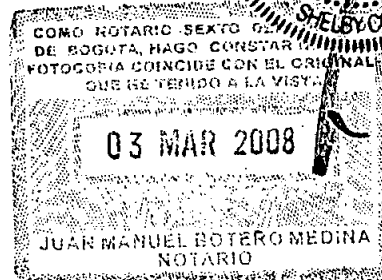
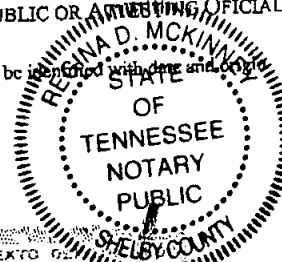
State Tennessee

This 28 day of January 2008

--- NOTARIO PÚBLICO O FUNCIONARIO AUTORIZADO --- NOTARY PUBLIC OR ATTESTING OFFICIAL ---

* Los documentos deben identificarse con fecha y origen

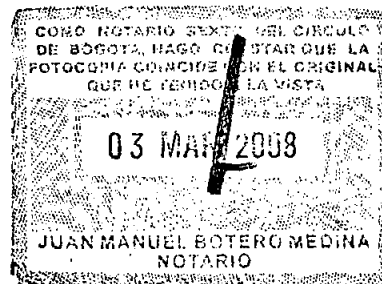
* Documents must be identified with date and origin



10

APOSTILLE	
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)	
1. Country:	This public document
2. has been signed by	
3. acting in the capacity of	
4. bears the seal/stamp of	
Certified	
5. at	6. the
7. by	
8. No.	
9. Seal/stamp	10. Signature
.....	

AHP\AHP\ID-117083\WPC16331



11

TRADUCCIÓN OFICIAL NO. 181/2008-

EL TEXTO QUE SIGUE ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN FRANCES. LLEVA LA FIRMA Y EL SELLO DE HELENA URIBE DE LEMOINE, TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL, SEGUN RESOLUCION NO. 3618 DEL MINISTERIO DE JUSTICIA DE COLOMBIA, DE FECHA 6 DE SEPTIEMBRE DE 1972.

TRADUCCION DE LOS SELLOS QUE SE ENCUENTRAN EN LA REPRESENTACION Y PODER OTORGADO POR **ST JUDE CHILDREN'S RESEARCH HOSPITAL**, DOMICILIADA EN 332 NORTH LAUDERDALE STREET, MEMPHIS, TENNESSEE 38105-2794, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA, A LOS DOCTORES **EMILIO FERRERO, LUZ CLEMENCIA DE PAEZ Y DANIEL PEÑA**.

DADO Y FIRMADO EL 28 DE ENERO DE 2008

POR: **J. SCOTT ELMER**, DIRECTOR DE LA OFICINA DE LICENCIAS DE TECNOLOGIAS

FIRAMDO: **J. SCOTT ELMER**.

ESTADO DE TENNESSEE - CONDADO SHELBY

YO, **DEBBIE STAMSON**, Oficial del Condado, por medio del presente certifico que **REGINA D. MCKINNEY**, ante quien fue otorgado el documento adjunto, era en el momento de suscribir el mismo NOTARIO PUBLICO, debidamente comisionado y juramentado y autorizado para tomar el mismo así como para tomar pruebas y reconocimientos de escrituras y demás instrumentos por escrito; certifico además que estoy familiarizado con la firma de dicho Notario Público o he comparado la firma que aparece en el documento con la firma autógrafa que se encuentra en mi Despacho y creo que la firma adjunta es auténtica. Certifico además que el instrumento adjunto ha sido ejecutado y reconocido de conformidad con las leyes del Estado de Tennessee.

EN TESTIMONIO DE LO ANTERIOR firmo y coloco el sello oficial de dicho Condado en Memphis, Tennessee, este día 31 de Enero de 2008.

FIRMADO: **DEBBIE STAMSON**, FUNCIONARIO.



CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDADES)

A los 28 días del mes de Enero de 2004, compareció ante mí: REGINE D. McKINNEY a quien conozco personalmente y quien firma este documento en representación de la sociedad/Compañía denominada **JAMES SCOTT ELMER**
Certifico:

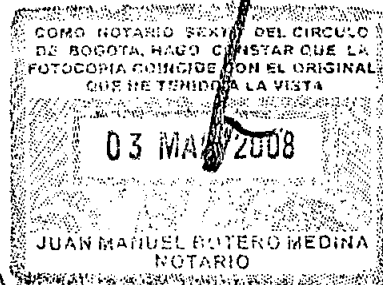
1. Que he visto los siguientes documentos:
Licencia de conducción de Tennessee, Identificación de St. Jude.
2. Que dichos documentos prueban lo siguiente:
 - 2.1 Que ST JUDE CHILDREN'S RESEARCH HOSPITAL, es una Sociedad/Compañía legalmente constituida y existente de acuerdo con las leyes del Tennessee, Estados Unidos de América
 - 2.2 Que el domicilio de Sociedad está situado en 332 North Lauderdale Street, Memphis, Tennessee 38105-2794, Estados Unidos de América,
 - 2.3 Que el objeto u objetos para los cuales se otorga el presente poder están comprendidos dentro del objeto social de la mencionada sociedad/Compañía
 - 2.4 Que _____ está autorizado para otorgar el presente Poder.

CIUDAD: MEMPHIS – TENNESSEE

HOY 28 de enero de 2008

FIRMADO: REGINA D. MCKINNEY, NOTARIO PÚBLICO,
ESTADO DE TENNESSEE

Handwritten signature



APOSTILLA

CONVENIO DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE DE 1961

1. PAIS: ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
EL PRESENTE DOCUMENTO PUBLICO
2. HA SIDO FIRMADO POR: DEBBIE STAMSON
3. ACTUANDO EN SU CAPACIDAD DE: OFICIAL DEL CONDADO DE
SHELBY, TENNESSEE
4. LLEVA EL SELLO DE: CONDADO DE SHELBY, TENNESSEE

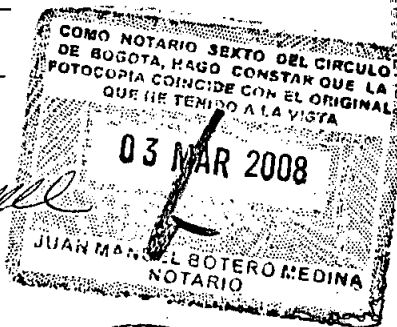
CERTIFICADO

5. EN: NASHVILLE, TENNESSEE
6. EL: LUNES, 4 DE FEBRERO DE 2008
7. POR: RILEY C. DARNELL, SECRETARIO DE ESTADO DE TENNESSEE
8. BAJO EL NO.: **08-1254**
9. SELLO: EL GRAN SELLO DEL ESTADO DE TENNESSEE
10. FIRMADO: RILEY C. DARNELL

LA TRADUCTORA OFICIAL

Helena Uribe de Lemoine

HELENA URIBE DE LEMOINE



COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA(S) FIRMA(S) DE

[Handwritten signature]

COINCIDE(N) CON LA FIRMA REGISTRADA POR EL (ELLOS) EN ESTA NOTARIA

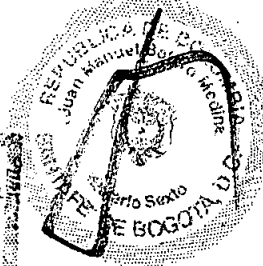
SANTAFE DE BOGOTA, 03 MAR 2008

 CODEX JURIS CIVILIS

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA

03 MAR 2008

JUAN MANUEL BOTERO MEDINA
NOTARIO



APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by T. Lawrence

3. acting in the capacity of Certifying Officer

4. bears the seal/stamp of U.S. Patent and Trademark Office

Certified

5. at Washington, D.C.

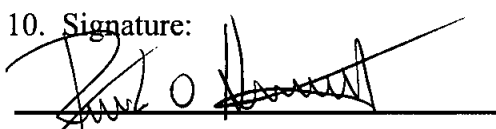
6. the sixth of February, 2008

7. by Assistant Authentication Officer, United States Department of State

8. No. 08012174-2

9. Seal/Stamp:

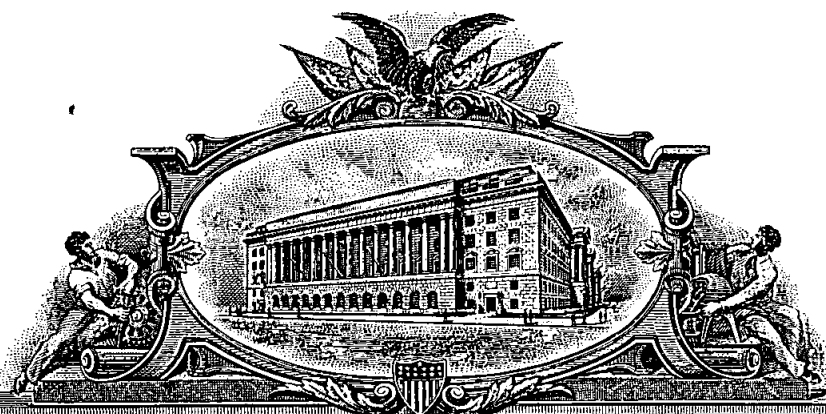
10. Signature:



Patrick O. Hatchett

15

A 7110443



THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
United States Patent and Trademark Office

February 01, 2008

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED IS A TRUE COPY FROM THE
RECORDS OF THIS OFFICE OF A DOCUMENT RECORDED ON
OCTOBER 20, 2006.

By Authority of the
Under Secretary of Commerce for Intellectual Property
and Director of the United States Patent and Trademark Office

T. LAWRENCE
Certifying Officer



Form PTO-1595 (Rev. 08/05)
OMB No. 0651-0027 (exp. 6/30/2008)

U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE
United States Patent and Trademark Office

RECORDATION FORM COVER SHEET PATENTS ONLY

To the Director of the U.S. Patent and Trademark Office: Please record the attached documents or the new address(es) below.

1. Name of conveying party(ies): Erich Hoffmann (9/20/2006), Aleksandr S. Lipatov (9/20/2006), Richard J. Webby (9/20/2006), Additional name(s) of conveying party(ies) attached? ☒ Yes ☐ No	2. Name and address of receiving party(ies) Name: <u>St. Jude Children's Research Hospital</u> Internal Address: _____ Street Address: _____ 332 North Lauderdale Street City: <u>Memphis</u> State: <u>Tennessee</u> Country: <u>United States of America</u> Zip: <u>38105-2794</u> Additional name(s) & address(es) attached? ☐ Yes ☒ No
3. Nature of conveyance/Execution Date(s): Execution Date(s): in parentheses after inventor name ☒ Assignment ☐ Merger ☐ Change of Name ☐ Security Agreement ☐ Joint Research Agreement ☐ Government Interest Assignment ☐ Executive Order 9424, Confirmatory License ☐ Other _____	4. Application or patent number(s): ☐ This document is being filed together with a new application. A. Patent Application No.(s) 11/460,584 60/705,808 B. Patent No.(s) Additional numbers attached? ☐ Yes ☒ No
5. Name and address to whom correspondence concerning document should be mailed: Name: <u>Gary M. Myles</u> <u>DARBY & DARBY P.C.</u> Internal Address: Atty. Dkt.: 02427/1203094-US1 and 02427/0203094-US0 Street Address: <u>P.O. Box 5257</u> City: <u>New York</u> State: <u>NY</u> Zip: <u>10150-5257</u> Phone Number: <u>(206) 262-8927</u> Fax Number: <u>(212) 527-7701</u> Email Address: <u>gmyles@darbylaw.com</u>	6. Total number of applications and patents involved: 2 7. Total fee (37 CFR 1.21(h) & 3.41) \$ <u>80.00</u> ☐ Authorized to be charged by credit card ☒ Authorized to be charged to deposit account ☐ Enclosed ☐ None required (government interest not affecting title)
9. Signature:  Signature <u>Gary M. Myles - 46,209</u> Name of Person Signing	8. Payment Information a. Credit Card Last 4 Numbers _____ Expiration Date _____ b. Deposit Account Number <u>04-0100</u> Authorized User Name <u>Gary M. Myles</u> Date <u>October 20, 2006</u> Total number of pages including cover sheet, attachments, and documents: 9

{S:\02427\1203094-us1\80083527.DOC 11/20/2006 15:47 FAX 2062628901}

700293090

PATENT
REEL: 018425 FRAME: 0444

5

RECORDATION FORM COVER SHEET (continued)	
Additional Conveying Party(ies)/Execution Date(s) (1. Continued): Elena A. Govorkova (9/20/2006), and Robert G. Webster (9/20/2006)	
Additional Assignees (2. Continued):	
Assignee Name: _____	
Internal Address: _____	
Street Address: _____	
City: _____ State: _____ Country: _____ Zip: _____	
Assignee Name: _____	
Internal Address: _____	
Street Address: _____	
City: _____ State: _____ Country: _____ Zip: _____	
Assignee Name: _____	
Internal Address: _____	
Street Address: _____	
City: _____ State: _____ Country: _____ Zip: _____	
Additional Applications and/or Patents (4. Continued):	
Additional Patent Application Numbers 4A. Continued:	Additional Patent Numbers 4B. Continued:
Additional numbers attached? ☐ Yes ☐ No	

Attorney Docket No.: 02427/1203094-US1
USAN 11/460,584

ASSIGNMENT

I, Erich Hoffmann, a citizen of Germany, residing at 1061 Natchez Point #179;
Memphis, Tennessee 38103; and

I, Aleksandr S. Lipatov, a citizen of Russian Federation, residing at 1309
Greenbrook Bend, Apt. 8; Bartlett, Tennessee 38134; and

I, Richard J. Webby, a citizen of New Zealand, residing at 233 N. McNeil St.;
Memphis, Tennessee 38112; and

I, Elena A. Govorkova, a citizen of Russian Federation, residing at 7591 Dexter
Hills Drive; Cordova, Tennessee 38016; and

I, Robert G. Webster, a citizen of US, residing at 295 Richbriar Street; Memphis,
Tennessee 38120;

and each of us, if more than one person is identified above (hereinafter "ASSIGNOR") in
consideration of the sum of Ten Dollars (\$10.00), or the equivalent thereof, and other good and
valuable consideration, the sufficiency of which and receipt of which are hereby acknowledged,
paid to ASSIGNOR by

St. Jude Children's Research Hospital

An organization organized under the laws of Tennessee, located at 332 North Lauderdale
Street, Memphis, Tennessee 38105-2794 (hereinafter "ASSIGNEE"), do hereby sell and assign
to said ASSIGNEE, its successors and assigns, the below indicated right, title, and interest,
throughout the world in and to my Invention entitled:

MODIFIED INFLUENZA VIRUS FOR MONITORING AND IMPROVING VACCINE
EFFICIENCY

invented by me and described in Patent Application No. 11/460,584, filed on July 27, 2006 and
U.S. Provisional Patent Application No. 60/705,808, filed August 4, 2005, in the United States

19

Attorney Docket No.: 02427/1203094-US1
USAN 11/460,584

of America; and all patents, divisions, reissues, continuations and any extensions thereof and rights of priority therein, said interest being my entire ownership interest in the same, to be held and enjoyed by said ASSIGNEE, its successors, assigns, or other legal representatives, to the full end of the term thereof, as fully and entirely as the same would have been held and enjoyed by me if this assignment and sale had not been made;

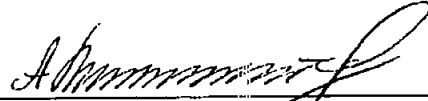
And for the consideration aforesaid, I hereby covenant and agree to and with said ASSIGNEE, its successors and assigns, that whenever ASSIGNEE, its counsel or representative, or the counsel or representative of its successors or assigns, shall advise that an amendment to, or a division of, or any other proceeding or action in connection with an application concerning said Invention, including interference proceedings, is lawful and desirable, or that a reissue or continuation or extension of such application or patent issuing therefrom is lawful and desirable, I will sign all papers and drawings, take all rightful oaths and affidavits, and do all acts necessary or required to be done for the procurement of all lawful rights associated with the Invention, or for the reissue or continuation or extension of the same, will do all acts necessary or required to secure in said ASSIGNEE, its successors or assigns, the title to and full benefit of all rights hereby assigned, without charge to said ASSIGNEE or its successors or assigns, but at its or their expense; and I hereby appoint every present or future officer of said ASSIGNEE as my agent to sign all such papers and to do all such necessary acts on my behalf, to the fullest extent permitted by law;

And I hereby authorize and request the Commission of Patents and Trademarks and any other granting authority to issue any Letters Patent resulting from said Invention and application(s) concerning same to said ASSIGNEE.

This assignment shall have an effective date corresponding to the last date of execution.

I declare under penalty of perjury under the laws of the United States of America, and under penalty of the laws of any other jurisdiction before which this document may be presented, that I have signed this document as my own free act and that all of the foregoing is true and correct.

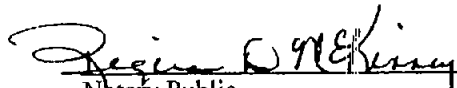
Attorney Docket No.: 02427/1203094-US1
USAN 11/460,584


Aleksandr S. Lipatov

Date: Sept. 20, 2006

United States of America)
State of Tennessee) ss.:
County of Shelby)

On this 20th day of September, 2006, before me
personally came Aleksandr S. Lipatov, to me known to be the individual
described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged execution
of the same.


Notary Public

MY COMMISSION EXPIRES
August 28, 2007



Attorney Docket No.: 02427/1203094-US1
USAN 11/460,584

Richard J. Webby
Richard J. Webby

Date: 9/20/06

United States of America)
State of Tennessee) ss.:
County of Shelby)

On this 20th day of September, 2006, before me
personally came Richard J. Webby, to me known to be the individual
described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged execution
of the same.

Regina D. King
Notary Public

MY COMMISSION EXPIRES:
August 28, 2007

NOTARY
PUBLIC
AT
LARGE

Attorney Docket No.: 02427/1203094-US1
USAN 11/460,584

Elena Govorkova

Elena A. Govorkova

Date: 9/20/06

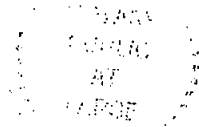
United States of America)
State of Tennessee) ss.:
County of Shelby)

On this 20th day of September, 2006, before me
personally came Elena A. Govorkova, to me known to be the individual
described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged execution
of the same.

Regina D. McKinney

Notary Public

MY COMMISSION EXPIRES
August 28, 2007



Attorney Docket No.: 02427/1203094-US1
USAN 11/460,584

Robert G. Webster
Robert G. Webster

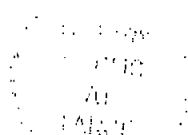
Date: 9-20-06

United States of America)
State of Tennessee) ss.:
County of Shelby)

On this 20th day of September, 2006, before me
personally came Robert G. Webster, to me known to be the individual
described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged execution
of the same.

Regina D. McKinn
Notary Public

MY COMMISSION EXPIRES
August 28, 2007



26

TRADUCCIÓN OFICIAL NO. 181/2008-.

ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

A TODOS A QUIENES LOS PRESENTES LLEGUEN, SALUDOS:

DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS
OFICINA DE MARCAS COMERCIALES Y PATENTES
DE LOS ESTADOS UNIDOS

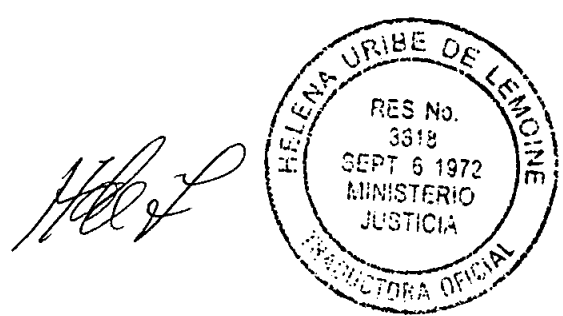
1° DE FEBRERO DE 2008

POR MEDIO DEL PRESENTE CERTIFICAMOS QUE EL DOCUMENTO ADJUNTO ES UNA COPIA FIDEDIGNA Y CORRECTA TOMADA DE UN DOCUMENTO REGISTRADO EN ESTE DESPACHO EL 20 DE OCTUBRE DE 2006.

POR AUTORIZACIÓN DEL SUB-SECRETARIO DE COMERCIO PARA LA PROPIEDAD INTELECTUAL Y DIRECTOR DE LA OFICINA DE MARCAS COMERCIALES Y PATENTES DE LOS ESTADOS UNIDOS.

FIRMADO: T. LAWRENCE, FUNCIONARIO CERTIFICADOR

HAY SELLO DE LA OFICINA DE MARCAS COMERCIALES Y PATENTES DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMERICA.



APOSTILLA

CONVENIO DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE DE 1961

1. PAIS: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
EL PRESENTE DOCUMENTO PUBLICO
2. HA SIDO FIRMADO POR: T. LAWRENCE
3. ACTUANDO EN SU CAPACIDAD DE: FUNCIONARIO CERTIFICADOR
4. LLEVA EL SELLO DE: OFICINA DE PATENTES Y MARCAS
COMERCIALES DE LOS ESTADOS UNIDOS

CERTIFICADO

5. EN: WASHINGTON, D.C.
6. EL: 6 DE FEBRERO DE 2008
7. POR: FUNCIONARIO ASISTENTE DE AUTENTICACIONES DEL
DEPARTAMENTO DE ESTADO DE LOS ESTADOS UNIDOS
8. BAJO EL NO.: **08012174-2**
9. SELLO: DEPARTAMENTO DE ESTADO, ESTADOS UNIDOS DE
AMERICA
10. FIRMADO: PATRICK O. HATCHETT

LA TRADUCTORA OFICIAL

Helena Uribe de Lemoine

HELENA URIBE DE LEMOINE



JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.
2008 MAR - 3 A 10: 05

33445
HELENA URIBE DE LEMOINE
EN EL
DEPARTAMENTO DE ESTADO
DE LOS ESTADOS UNIDOS

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

28

TRADUCCIÓN OFICIAL NO. 181/2008-.

Forma: PTO-1595 (rev.08/05)
CMB No. 0651-0027 (exp. 6/30/2008)

**HOJA DE CUBIERTA DE LA HOJA DE REGISTRO
UNICAMENTE PARA PATENTES**

Departamento de Comercio de los
Estados Unidos
Oficina de Marcas y Patentes

**Al Honorable Comisionado de Marcas y Patentes: sírvase registrar los documentos originales adjuntos
o una copia de los mismos.**

1. Nombre de las partes cedentes: ERICH HOFFMANN (9/20/2006) ALEKSANDR S.LIPAOV (9/20/2006) RICAHRD J. WEBBY (9/20/2006) Nombres adicionales de las partes cedentes: Si ☒ No	2. Nombre y dirección de la parte receptora: Nombre: ST. JUDE CHILDREN'S RESEARCH HOSPITAL Dirección Interna: 332 NORTH LAUDERDALE STREET Ciudad: Memphis Estado: Tennessee Código postal: San Diego, CA 92121 País: Estados Unidos de América Zip: 38105 2794 Nombres y direcciones adicionales: Si No ☒
3. Naturaleza del traspaso: Fecha de ejecución: en paréntesis después del nombre del inventor ☒ Cesión	
4. Número de la solicitud o número de patente: Solicitud de Patente No. 11/460,584, 60/705,808 Números adicionales adjuntos? NO	

5. Nombre y dirección de la parte a quien debe enviarse la correspondencia relacionada con el documento: Nombre: GARY M. MYLES DARBY & DARBY P.C. Dirección interna: Numero de expediente: 02427/1203094-US1 Y 02427/0203094- US0 Dirección postal: P. O. Box 5257 Ciudad: NEW YORK, ESTADO N.Y. Código Postal: 10150-5257 TELÉFONO: (206) 262-8927 FAX: (212) 527-7701 EMAIL: gmyles@darbylaw.com	6. Número de solicitudes y de patentes involucradas: 2 7. No. total de derechos (37 CFR 3.41) \$80.00 ☒ Autorizo cargar a mi tarjeta de crédito 8. Número de cuenta de depósito: 04-0100 Autorizo usar el nombre de: Gary M. Myles
--	--

9. Firma,

Firmado: Ilegible
Nombre de la persona que firma: GARY M. MYLES - 46.209
Fecha: 20 DE OCTUBRE DE 2006

Número total de páginas incluyendo la hoja de cubierta, los anexos y el documento: 9

Fecha de ejecución de Partes de Traspaso adicionales:
Elena A Govorkova (9/20/2006) y Roberto G. Webster (9/20/2006)

[Handwritten signature]



CESION

Yo, ERICH HOFFMANN, ciudadano Alemán, residente en 1061 Natchez Point #179; Memphis, Tennessee 38103; y

Yo, Alekasandr S. Lipatov, ciudadano Ruso, residente en 1309 Greenbrook Bend, Atp. 8; Bartlett, Tennessee 38134; y

Yo, Richard J. Webby, ciudadano Nueva Zelandés, residente en 233 N. McNeil st.; Memphis, Tennessee 38112; y

Yo, Elena A. Govorkova, ciudadana Ruso, residente a 7591 Dexter Hills Drive; Cordova, Tennessee 38016; y

Yo, Robert G. Webster, ciudadano de Estados Unidos, residente a 295 Richbriar Street; Memphis, Tennessee 38120;

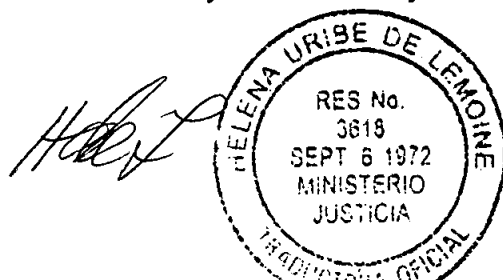
Y cada uno de nosotros, si mas de una persona está identificada arriba (de aquí en adelante el CEDENTE) en consideración a la suma de Diez Dólares (US\$10.00) o el equivalente de la misma y otras buena y valiosas consideraciones, cuya suficiencia y recibo se reconoce por el presente, pagado al CEDENTE por

ST JUDE CHILDREN'S RESEARCH HOSPITAL

Una organización constituida bajo las leyes de Tennessee, domiciliada en 332 North Lauderdale Street, Memphis, Tennessee 38105-2794 (de aquí en adelante el CESIONARIO) por medio del presente vendemos y cedemos a dicho CESIONARIO, a sus sucesores y cesionarios, el derecho, título e interés indicado a continuación en todo el mundo en y para mi invención titulada

VIRUS MODIFICADO DE LA INFLUENZA, MONITOREO Y MEJORA DE LA EFICIENCIA DE LA VACUNA

Inventado por mí y descrito en la Solicitud de Patente No. 11/460,584 radicada el 27 de Julio de 2006 y la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos No. 60/705,808, radicada el 4 de Agosto de 2005 en los Estados Unidos de América y todas las patentes, divisiones, remisiones, continuaciones y prórrogas de la misma y los derechos de propiedad pertenecientes a la misma siendo dicho interés de mi propiedad total para que sea disfrutado y gozado por el CESIONARIO, sus sucesores y cesionarios y otros representantes legales con la



30

TRADUCCIÓN OFICIAL NO. 181/2008-.

plena extensión de la vigencia del presente tal como los mismos hubiesen sido retenidos y disfrutados por mí si la presente Cesión y venta no se hubiese efectuado.

Y por la consideración arriba mencionada, por medio del presente acuerdo y acepto con dicho CESIONARIO, sus sucesores y cesionarios, que siempre que el CESIONARIO, su asesor o representante, o el asesor o representante de sus sucesores o cesionarios consideren que es necesario efectuar una enmienda o división o cualquier otro procedimiento o acción en relación con una solicitud relativa a dicha invención, incluyendo los procesos de interferencia, sea legal y deseable, o que una reexpedición o continuación o prórroga de dicha solicitud o patente expedida a partir de lo anterior sea legal y deseable, firmaré todos los documentos y dibujos, haré todas las declaraciones juramentadas y haré todos los actos necesarios o requeridos para obtener todos los derechos legales asociados con la invención o para la reexpedición o continuación o extensión de los mismos, haré todos los actos necesarios o requeridos para garantizar a dicho CESIONARIO, a sus sucesores y cesionarios, el título y el pleno beneficio de todos los derechos aquí cedidos sin costo alguno para el CESIONARIO o sus cesionarios, sus sucesores y cesionarios, pero por su cuenta y gasto; y por medio del presente nombro a un funcionario presente o futuro de dicho CESIONARIO como mi agente para firmar todos los documentos o hacer todos los actos que se consideren necesarios en mi nombre en la plena extensión permitida por la ley.

Y por medio del presente autorizo y solicito al Comisionado de Patentes y Marcas Comerciales y a cualquier otra autoridad otorgante que expida las Cartas de Patente que resulten de dicha invención y solicitud relativa a los mismos, a dicho CESIONARIO.

La presente Cesión tiene una fecha efectiva que corresponde a la última fecha de ejecución.

Declaro bajo la sanción de perjurio bajo las leyes de los Estados Unidos de América y bajo las sanciones de las leyes de cualquier otra jurisdicción ante quienes el presente documento pueda ser presentado, que he firmado éste documento como mi acto libre y voluntario y que todo lo anterior es verdadero y correcto.



TRADUCCIÓN OFICIAL NO. 181/2008-.

FIRMADO: *Erich Hoffmann*

FECHA: 20 DE SEPTIEMBRE DE 2006

ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
ESTADO DE TENNESSEE
CONDADO DE SHELBY

Este día 20 de Septiembre de 2006, ante mí personalmente compareció **Erich Hoffmann** a quien conozco como la persona descrita anteriormente y quien ejecutó el anterior instrumento y reconoció la ejecución del mismo.

FIRMADO: REGINA D. MCKINNEY, NOTARIO PUBLICO, CON COMISION
HASTA EL 28 DE AGOSTO DE 2007.
HAY SELLO DEL NOTARIO.

FIRMADO: **Aleksandr S. LIPATOV**

FECHA: 20 DE SEPTIEMBRE DE 2006

ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
ESTADO DE TENNESSEE
CONDADO DE SHELBY

Este día 20 de Septiembre de 2006, ante mí personalmente compareció **Aleksandr S. Lipatov** a quien conozco como la persona descrita arriba y quien ejecutó el anterior instrumento y reconoció la ejecución del mismo.

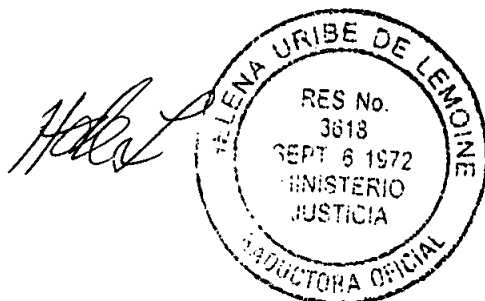
FIRMADO: REGINA D. MCKINNEY, NOTARIO PUBLICO, CON COMISION
HASTA EL 28 DE AGOSTO DE 2007.
HAY SELLO DEL NOTARIO.

FIRMADO: **Richard J. Webby**

FECHA: 20 DE SEPTIEMBRE DE 2006

ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
ESTADO DE TENNESSEE
CONDADO DE SHELBY

Este día 20 de Septiembre de 2006, ante mí personalmente compareció **Richard J. Webby** a quien conozco como la persona descrita arriba y quien ejecutó el anterior instrumento y reconoció la ejecución del mismo.



32

TRADUCCIÓN OFICIAL NO. 181/2008-.

FIRMADO: REGINA D. MCKINNEY, NOTARIO PUBLICO, CON COMISION
HASTA EL 28 DE AGOSTO DE 2007.
HAY SELLO DEL NOTARIO.

FIRMADO: **Elena A. Govorkova**
FECHA: 20 DE SEPTIEMBRE DE 2006

ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
ESTADO DE TENNESSEE
CONDADO DE SHELBY

*Este día 20 de Septiembre de 2006, ante mí personalmente compareció **Elena A. Govorkov** a quien conozco como la persona descrita arriba y quien ejecutó el anterior instrumento y reconoció la ejecución del mismo.*

FIRMADO: REGINA D. MCKINNEY, NOTARIO PUBLICO, CON COMISION
HASTA EL 28 DE AGOSTO DE 2007.
HAY SELLO DEL NOTARIO.

FIRMADO: **Robert G. Webster**
FECHA: 20 DE SEPTIEMBRE DE 2006

ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
ESTADO DE TENNESSEE
CONDADO DE SHELBY

*Este día 20 de Septiembre de 2006, ante mí personalmente compareció **Robert G. Webster** a quien conozco como la persona descrita arriba y quien ejecutó el anterior instrumento y reconoció la ejecución del mismo.*

FIRMADO: REGINA D. MCKINNEY, NOTARIO PUBLICO, CON COMISION
HASTA EL 28 DE AGOSTO DE 2007.
HAY SELLO DEL NOTARIO.



8
33

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
15 February 2007 (15.02.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/019094 A2

(51) International Patent Classification:

A61K 39/145 (2006.01) C12N 7/00 (2006.01)
C12Q 1/70 (2006.01) C07K 14/11 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)

(74) Agents: LUDWIG, S., Peter et al.; DARBY & DARBY
P.C., P.O. Box 5257, New York, NY 10150-5257 (US).

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

(21) International Application Number:

PCT/US2006/029575

(22) International Filing Date: 28 July 2006 (28.07.2006)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

60/705,808 4 August 2005 (04.08.2005) US

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, 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, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Applicant (for all designated States except US): ST. JUDE
CHILDREN'S RESEARCH HOSPITAL [US/US]; 332
North Lauderdale Street, Memphis, TN 38105-2794 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): HOFFMANN,
Erich [DE/US]; 1061 Natchez Point #179, Memphis,
TN 38103 (US). LIPATOV, Aleksandr, S. [RU/US];
1309 Greenbrook Bend, Apt. 8, Bartlett, TN 38134
(US). WEBSTER, Robert, G. [US/US]; 295 Richbriar
Street, Memphis, TN 38120 (US). WEBBY, Richard, J.
[NZ/US]; 233 N. McNeil St., Memphis, TN 38112 (US).
GOVORKOVA, Elena, A. [RU/US]; 7591 Dexter Hills
Drive, Cordova, TN 38016 (US).

Published:

— without international search report and to be republished
upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: MODIFIED INFLUENZA VIRUS FOR MONITORING AND IMPROVING VACCINE EFFICIENCY

(57) Abstract: The immunogenicity of the influenza virus hemagglutinin (HA) molecule may be increased by substitutions of amino acids in the HA sequence. The substitution of specific HA residues, such as asparagine at position 223 of H5 HA, increase the sensitivity of the hemagglutinin inhibition (HI) assay by altering receptor specificity and/or antibody-antigen binding. HA molecules containing such substitutions will be useful in the development of diagnostic reference viruses and improved influenza vaccines.



WO 2007/019094 A2

**MODIFIED INFLUENZA VIRUS FOR MONITORING
AND IMPROVING VACCINE EFFICIENCY**

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

[01] This application claims the benefit of U.S. Provisional Application No. 60/705,808, filed
5 August 4, 2005, which is herein incorporated by reference in its entirety.

**STATEMENT REGARDING FEDERALLY SPONSORED
RESEARCH OR DEVELOPMENT**

[02] The research leading to the present invention was supported by grant AI95357 from the
National Institute of Allergy and Infectious Disease and by Cancer Center Support (CORE) grant
10 CA21765 from the National Institutes of Health. Accordingly, the U.S. government has certain
rights in the invention.

REFERENCE TO A COMPACT DISK APPENDIX

[03] Not applicable.

FIELD OF THE INVENTION

15 [04] In a general sense, the invention relates to increasing the antigenicity and/or
immunogenicity of a group of influenza virus subtypes.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Influenza Viruses

[05] Influenza viruses, most notably particular strains of A and B virus, are a serious cause of
20 morbidity and mortality throughout the world, resulting in annual disease outbreaks.
Periodically but at irregular intervals pandemics occur and result in particularly high levels of
illness and death. Pandemics are historically the result of novel virus subtypes of influenza A,
created by reassortment of the segmented genome (antigenic shift), whereas annual epidemics
are generally the result of evolution of the surface antigens of influenza A and B virus (antigenic
25 drift). Human influenza viruses often originate from avian strains of influenza virus so that
influenza infection is at its basis a zoonosis. There is also evidence that swine can serve as an
intermediate host ("mixing vessel") for the generation of new avian-originated strains that are

35

pathogenic in humans (Scholtissek *et al.*, Virology 1985, 147:287). The H5N1 influenza A outbreak in Hong Kong in 1997 showed that highly pathogenic influenza A viruses can also be transmitted directly from avian species to humans (Claas *et al.*, Lancet 1998, 351:472; Suarez *et al.*, J.Virol. 1998, 72:6678; Subbarao *et al.*, Science 1998, 279:393; Shortridge, Vaccine 1999, 17 (Suppl. 1): S26-S29). In 2003, the H5N1 viruses in Southeast Asia comprised different co-circulating genotypes, but in 2004 a single genotype, known as the "Z-genotype", became dominant (Li *et al.*, Nature 2004, 430:209). Current evidence indicates that fatal human cases resulted from the direct transmission of this genotype from birds to humans and that it also infected cats, with direct cat to cat transmission (Kuiken *et al.*, Science 2004, 306:241). This and other evidence of the changing host range and widespread distribution of this virus raised concern that H5N1 viruses may acquire the characteristics that allow transmission from human to human. Humans would have no immunity to such new H5N1 viruses, which could cause catastrophic pandemic influenza (Fouchier *et al.*, Nature 2005, 435:419). The potential of influenza A viruses to generate new pathogenic strains from a vast number of circulating strains in animal reservoirs indicates that disease control requires monitoring these viruses and developing improved antiviral therapies and vaccines. The speed with which new viral strains develop demands vigilance in this monitoring effort, including improved techniques for assessing the efficacy of vaccines to novel strains.

[06] Influenza A, B and C, of the family *Orthomyxoviridae*, all have a segmented negative strand RNA genome that is replicated in the nucleus of the infected cell, has a combined coding capacity of about 13 kb, and contains the genetic information for ten viral proteins. Specifically, influenza viruses have eight negative-sense RNA (nsRNA) gene segments that encode at least 10 polypeptides, including RNA-directed RNA polymerase proteins (PB2, PB1 and PA), nucleoprotein (NP), neuraminidase (NA), hemagglutinin (HA, which after enzymatic cleavage is made up of the association of subunits HA1 and HA2), the matrix proteins (M1 and M2) and the non-structural proteins (NS1 and NS2) (Krug *et al.*, In The Influenza Viruses, R.M. Krug, ed., Plenum Press, New York, 1989, pp. 89-152).

[07] Recently developed reverse-genetics systems have allowed the manipulation of the influenza viral genome (Palese *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996, 93:11354; Neumann and

8
36

Kawaoka, *Adv. Virus Res.* 1999, 53:265; Neumann *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 96:9345; Fodor *et al.*, *J. Virol.* 1999, 73:9679). For example, it has been demonstrated that the plasmid-driven expression of eight influenza nsRNAs from a pol I promoter and the coexpression of the polymerase complex proteins result in the formation of infectious influenza
5 A virus (Hoffmann *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000, 97:6108).

[08] The virus particle of the influenza virus has a size of about 125 nm and consists of a core of negative sense viral RNA associated with the nucleoprotein, surrounded by a viral envelope with a lipid bilayer structure. The inner layer of the viral envelope is composed predominantly of matrix proteins and the outer layer contains most of the host-derived lipid material. The so-called "surface proteins", neuraminidase (NA) and hemagglutinin (HA), appear as spikes on the
10 surface of the viral body. Infectivity of novel influenza viruses depends on the cleavage of HA by specific host proteases, whereas NA is involved in the release of progeny virions from the cell surface and prevents clumping of newly formed virus.

[09] The HA and NA proteins embedded in the viral envelope are the primary antigenic
15 determinants of the influenza virus (Air *et al.*, *Structure, Function, and Genetics*, 1989, 6:341-356; Wharton *et al.*, *In The Influenza Viruses*, R. M. Krug, ed., Plenum Press, New York, 1989, pp. 153-174). Due to reassortment of influenza segmented genome, new HA and NA variants are constantly created for which a newly infected organism has no anamnestic immune response. HA glycoprotein is the major antigen for neutralizing antibodies and is involved in the binding of
20 virus particles to receptors on host cells.

[10] HA molecules from different virus strains show significant sequence similarity at both the nucleic acid and amino acid levels. This level of similarity varies when strains of different subtypes are compared, with some strains clearly displaying higher levels of similarity than others (Air, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, 78:7643). The levels of amino acid similarity
25 vary between virus strains of one subtype and virus strains of other subtypes (Air, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, 78:7643). This variation is sufficient to establish discrete subtypes and the evolutionary lineage of the different strains, but the DNA and amino acid sequences of different strains are still readily aligned using conventional bioinformatics techniques (Air, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, 78:7643; Suzuki and Nei, *Mol. Biol. Evol.* 2002, 19:501).

9
38

Influenza Vaccines

[11] The influenza vaccines currently licensed by public health authorities for use in the United States and Europe are inactivated influenza vaccines as well as the live attenuated FLUMIST vaccine in the United States. Viruses presenting epidemiologically important influenza A and influenza B strains are grown in embryonated chicken eggs and the virus particles are subsequently purified and inactivated by chemical means to form vaccine stocks. Each year the WHO selects subtypes which most likely will circulate for that year for vaccine development.

[12] Although influenza vaccines have been in use since the early 1940's for human vaccination and since the late 1960's for equine vaccination, the existence of extensive animal reservoirs, combined with the threat of emergence of a novel influenza virus capable of causing a pandemic, has spurred research into novel therapies with which to fight the virus. Several important advances in the field of influenza have occurred in the last few years (reviewed in Cox and Subbarao, *Lancet* 1999, 354:1277-82). For example, an experimental live, attenuated, intranasally administered trivalent influenza vaccine was shown to be highly effective in protecting young children against influenza A H3N2 and influenza B. Other approaches to improve the efficacy of the current (killed) influenza virus vaccines include the generation of cold-adapted and genetically engineered influenza viruses containing specific attenuating mutations (reviewed in Palese *et al.*, *J. Infect. Dis.*, 1997, 176 Suppl 1:S45-9). It is hoped that these genetically altered viruses, in which the HA and NA genes from circulating strains have been incorporated by reassortment, can be used as safe live influenza virus vaccines to induce a long-lasting protective immune response in humans. Although cold-adapted vaccines appear to be efficacious in children and young adults, they may be too attenuated to stimulate an ideal immune response in elderly people, the major group of the 20000-40000 individuals in the USA dying each year as a result of influenza infection.

[13] Readily available vaccines would provide the most effective tool against emergent pandemic influenza. After the 1997 H5N1 outbreak in Hong Kong, vaccines produced by two different approaches were tested in humans. Conventional subunit H5 vaccine produced from A/duck/Singapore/3/97 was poorly immunogenic in humans, even against antigenically closely related strains and after multiple vaccination (Nicholson *et al.*, *Lancet* 2001, 357:1937;

Stephenson *et al.*, Journal of Infectious Disease 2005, 191:1210). The use of the adjuvant MF59 increased the antibody titer of this H5 vaccine (Stephenson *et al.*, Vaccine 2003, 21:1687). Vaccination with inactivated "split" vaccine derived from nonpathogenic A/duck/HK/836/80 (H3N1) virus and the modified H5 hemagglutinin from A/HK/156/97 (H5N1) virus induced
5 barely detectable titers of neutralizing antibodies (Takada *et al.*, Journal of Virology 1999, 73:8303). Thus, although these H5N1 vaccines were well tolerated, they appeared to be poorly immunogenic. The current lack of effective vaccines against H5N1 virus strains increases the threat of these viruses to cause pandemic disease.

Influenza Vaccine Immunogenicity

10 [14] Serum antibody titer methods are the accepted surrogate measures of immune protection after vaccination or viral infection. The predominantly used serum antibody titer methods are virus neutralization titer assays and hemagglutinin inhibition (HI) titer assays. These assays are based on the ability of influenza antibodies from human serum to cross react with antigens under
15 *in vitro* conditions. Assays are selected for a given situation based not only on their ability to provide consistent and applicable results but also based on their ease of use and the facility requirements for each type of assay.

[15] Briefly stated, the virus neutralization assay examines the ability of antibodies from a serum sample to block the infection of cultured cells by influenza virus. The assay is carried out by creating serial dilutions (titers) of a serum sample and combining each of these dilutions with
20 a standard amount of infectious virus. Each dilution mixture is then presented to a defined cell culture and the resulting infection rates assayed. The virus neutralization titer assay is considered to be an extremely useful and reliable test to examine the level of immunoprotective antibodies present in a given individual. It is, however, dependent on specialized cell culture facilities and therefore is not universally available. The methodology is also laborious and time
25 consuming hence poorly suited to screening large numbers of samples.

[16] The hemagglutinin inhibition (HI) assay similarly examines the ability of antibodies from a serum sample to bind with a standardized reference virus. The basis for this assay is the fact that influenza viruses will bind to and agglutinate erythrocytes. In the HI assay, serial dilutions of serum sample are mixed with standard amounts of reference virus and after a set incubation

H
39

period added to erythrocytes. The association between reference viruses and erythrocytes into complexes is then detected visually. The highest dilution of serum that inhibits hemagglutinin is read as the hemagglutinin inhibition titer. Although not as sensitive of vaccine immunogenicity as other assays, the HI assay is widely employed due to its relatively simple technology and laboratory requirements.

[17] Given the limitations discussed above on the current techniques available for influenza vaccine development and assessment, there is a need for improvements in techniques of immunogenicity assessment to test immune response after infection as well as vaccine efficacy.

SUMMARY OF THE INVENTION

[18] The present invention provides for amino acid substitutions in the hemagglutinin (HA) molecule of influenza A that can alter the antigenicity and immunogenicity of the HA. These substitutions may alter antigenic sites by altering receptor specificity and/or antibody-antigen binding. In a variety of embodiments, the increased antigenicity resulting from the substitution may be useful to increase the sensitivity of the hemagglutinin (HI) assay on serum taken from infected animals. This information is important in the production of diagnostic reference viruses and new vaccines for influenza. Preferably, the amino acid substitution results in molecules with the immunogenicity characteristics of the amino acid substitution of asparagine at H5 HA location 223.

[19] Thus, within certain aspects, the present invention includes an influenza virus hemagglutinin (HA) molecule comprising one or more amino acid substitution in the receptor binding site that makes the HA molecule more antigenic with respect to antibodies specific for the HA molecule lacking the amino acid substitution in its receptor binding site. The influenza virus increased antigenicity HA molecule may include the amino acid asparagine at the position corresponding to position 223 in H5 HA, wherein the inclusion of asparagine results in an increased reactivity with antisera derived from an animal exposed to an influenza virus with a wildtype HA molecule. The influenza virus increased antigenicity HA molecule may include the amino acid asparagine at the position corresponding to position 223 in H5 HA, wherein the HA molecule does not originate with human H5 isolate A/HK/213/03 and the inclusion of asparagine at position 223 results in an increased reactivity with antisera derived from an animal exposed to

42
40

an influenza virus. In some embodiments, the amino acid substitution alters a glycosylation site. In some embodiments, the influenza virus is a human influenza A virus. For example, the human influenza A virus may be a member of the H5 subtype. The human influenza A virus may be a A/Vietnam/1203/04 (H5N1) virus. In some embodiments, the influenza virus is an influenza B virus. The invention includes influenza virus increased antigenicity HA molecules that are derived from an avian influenza virus.

[20] Within other aspects, the invention includes a recombinant influenza virus comprising an influenza virus hemagglutinin (HA) molecule comprising one or more amino acid substitution in the receptor binding site that makes the HA molecule more antigenic with respect to antibodies specific for the HA molecule lacking the amino acid substitution in its receptor binding site. The recombinant virus may include a modified HA molecule derived from H5N1 influenza virus in the genetic background of an influenza A virus. The influenza A virus may be a master strain virus. The recombinant virus may be used as a diagnostic reference virus in a hemagglutinin inhibition (HI) assay. The recombinant influenza virus may be included in a hemagglutinin inhibition (HI) assay kit.

[21] Still further aspects of the invention include reverse genetics systems for making a virus containing an influenza virus hemagglutinin (HA) molecule comprising an amino acid substitution in the receptor binding site that makes the HA molecule more antigenic with respect to antibodies specific for the HA molecule lacking the amino acid substitution in its receptor binding site.

[22] Yet other aspects of the invention disclosed herein include methods of making a virus containing an influenza virus hemagglutinin (HA) molecule comprising one or more amino acid substitution in the receptor binding site that makes the HA molecule more antigenic with respect to antibodies specific for the HA molecule lacking the amino acid substitution in its receptor binding site. In some embodiments, the method comprises introducing a recombinant vector that expresses the increased antigenicity HA molecule in a reverse genetics system.

[23] In related aspects, the invention further provides methods for determining the efficacy of an influenza virus vaccine in an animal. In some embodiments, the method comprises reacting

43
91

antisera derived from a vaccinated animal with an influenza virus hemagglutinin (HA) molecule comprising one or more amino acid substitution in the receptor binding site that makes the HA molecule more antigenic with respect to antibodies specific for the HA molecule lacking the amino acid substitution in the receptor binding site which is present in the influenza virus vaccine. In some embodiments, the increased antigenicity HA molecule originates with human H5N1 isolate A/HK/213/03 and the inclusion of asparagine at the position that corresponds to position 223 in HA from H5N1 virus results in an increased reactivity with antisera derived from the vaccinated animal. In some embodiments, the animal is a human. In other embodiments, the animal is a ferret.

[24] Yet other related aspects of the present invention provide methods for producing an influenza virus comprising a hemagglutinin (HA) molecule, which method comprises culturing a reverse genetics system in which DNA encoding HA encodes one or more amino acid substitution in the receptor binding site that makes the HA molecule more antigenic with respect to antibodies specific for the HA molecule lacking the amino acid substitution in the receptor binding site by a reverse genetics process.

[25] The invention further provides methods for increasing the sensitivity of a hemagglutinin inhibition (HI) assay, which methods comprise reacting antisera derived from the vaccinated or infected animal with an influenza virus hemagglutinin (HA) molecule comprising one or more amino acid substitution in the receptor binding site that makes the HA molecule more antigenic with respect to antibodies specific for the HA molecule lacking the amino acid substitution in the receptor binding site. In some embodiments, the method for increasing the sensitivity of a HI assay results in at least 2-fold increase in sensitivity of a hemagglutinin inhibition (HI) assay. In some embodiments, the method for increasing the sensitivity of a HI assay results in at least 4-fold increase in sensitivity of a hemagglutinin inhibition (HI) assay.

[26] Another aspect of the invention includes methods for determining whether an animal has been exposed to an influenza virus. In some embodiments, the method comprises reacting antisera derived from the animal with a diagnostic reference virus, which is derived from the influenza virus in question but comprises an influenza virus hemagglutinin (HA) molecule comprising an amino acid substitution in the receptor binding site that makes the HA molecule

14
42

more antigenic with respect to antibodies specific for the HA molecule lacking the amino acid substitution in its receptor binding site resulting in an increased reactivity with the antisera. In some embodiments, the animal is a human. In other embodiments, the animal is a ferret.

5 [27] The invention includes in yet other aspects methods for determining whether an animal has been exposed to an influenza virus. In some embodiments, the method comprises reacting antisera derived from the animal with a diagnostic reference virus, which is derived from the influenza virus in question but comprises a modified influenza virus HA molecule comprising the amino acid asparagine at the position corresponding to position 223 in H5 HA, wherein the inclusion of asparagine results in an increased reactivity with antisera derived from an animal
10 exposed to an influenza virus with a wildtype HA molecule, resulting in an increased reactivity with the antisera. In some embodiments, the method for determining whether an animal has been exposed to an influenza virus includes reacting antisera derived from the animal with a diagnostic reference virus, which is derived from the influenza virus in question but comprises a modified influenza virus HA molecule comprising the amino acid asparagine at the position
15 corresponding to position 223 in H5 HA, wherein the HA molecule does not originate with human H5 isolate A/HK/213/03 and the inclusion of asparagine at position 223 results in an increased reactivity with antisera derived from an animal exposed to an influenza virus. In some embodiments, the animal is a human. In other embodiments, the animal is a ferret.

20 [28] Also included within the invention are influenza vaccine viruses comprising a hemagglutinin (HA) molecule comprising an amino acid substitution in the receptor binding site that makes the HA molecule more antigenic with respect to antibodies specific for the HA molecule lacking the amino acid substitution in the receptor binding site and wherein the modification results in an increased immunogenicity of said vaccine virus.

25 [29] One aspect of this invention includes isolated nucleic acids encoding an influenza virus hemagglutinin (HA) molecule comprising an amino acid substitution in the receptor binding site that makes the HA molecule more antigenic with respect to antibodies specific for the HA molecule lacking the amino acid substitution in its receptor binding site. In some embodiments, the influenza virus HA molecule encoded by the isolated nucleic acid comprises an amino acid asparagine at the position corresponding to position 223 in H5 HA, wherein the HA molecule

does not originate with human H5 isolate A/HK/213/03 and the inclusion of asparagine at position 223 results in an increased reactivity with antisera derived from an animal exposed to an influenza virus.

[30] The invention further includes methods for preparing nucleic acids encoding an influenza virus hemagglutinin (HA) molecule comprising an amino acid substitution in the receptor binding site that makes the HA molecule more antigenic with respect to antibodies specific for the HA molecule lacking the amino acid substitution in its receptor binding site. In some embodiments, the method comprises introducing a nucleotide sequence into a nucleic acid encoding the HA molecule lacking the amino acid substitution in the receptor binding site, which results in an amino acid substitution in the sequence of the HA molecule that makes the HA molecule more antigenic with respect to antibodies for the HA molecule lacking the amino acid substitution.

[31] The present invention meets these and other aspects of the invention, as set forth in greater detail in the Detailed Description and Examples.

15 **DESCRIPTION OF THE DRAWINGS**

[32] FIG. 1 is a graph indicating HI antibody titers in ferrets inoculated with H5N1 influenza viruses isolated in 2003 and 2004 (A); HI and virus neutralizing titers in ferrets immunized with Δ H5N1/03 and Δ H5N1/04 viruses (B). In FIG. 1A, sera were collected on day 28 after inoculation with 10^6 EID₅₀ of H5N1 viruses and titrated against 4 hemagglutinating units (HAU) of homologous virus. Data are representative values from two or 4 sera. In FIG. 1B, sera were collected from ferrets vaccinated x 2 with 7 μ g HA of Δ H5N1/03 and Δ H5N1/04 viruses and titrated against 4 HAU and 100 TCID₅₀ of homologous virus, respectively.

[33] FIG. 2 is a graph indicating virus titers in nasal washes of vaccinated and control ferrets after challenge with A/Vietnam/1203/04 (H5N1) virus. Ferrets vaccinated with Δ H5N1/04 or Δ H5/04 recombinant viruses were inoculated intranasally with 10^6 EID₅₀ of A/Vietnam/1203/04 virus. Titers are the mean values ($\log_{10}$ EID₅₀/0.1ml) $\pm$ SD determined in the nasal washes of 3 ferrets.

[34] Note that differences in titers between vaccinated and control groups are significant at P values 0.0028 – 0.0173 according to unpaired t test results.

[35] FIG. 3 is a molecular model of the H5 HA polypeptide showing the location of amino acid at positions 154 and 223 in the 3D structure of the HA of A/duck/Singapore/3/97 (H5N3) virus.

5 In Fig. 3A, the receptor binding site of the amino acids in the 3D structure are indicated. In FIG. 3B, the circle represents the interface between the monomer shown and two other monomers (not shown) in the trimeric HA. The amino acid at position 223 is located in the 220-loop of the receptor binding domain between the glutamine generally present at location 222 and the glycine generally present at location 224.

10

DETAILED DESCRIPTION

[36] The present invention provides for amino acid sequence changes of the hemagglutinin (HA) molecule of influenza virus, which make the HA molecule more antigenic with respect to antibodies specific for HA molecules lacking the changes. Such sequence changes include substitutions and deletions. The resulting HA is referred to as an “increased antigenicity HA.”

15 [37] The increased antigenicity HA molecule is useful in testing vaccine efficacy, as the change increases the sensitivity of diagnostic tests for antibodies against influenza virus in serum. In a specific embodiment the virus is an influenza A virus. In an alternate embodiment, the virus can also be an influenza B virus, and in still another embodiment it can be an influenza C virus. In an embodiment in which the influenza is an influenza A virus, it can be a H5-subtype influenza
20 A virus. In a more specific embodiment, the H5-subtype HA molecule is modified to include the amino acid asparagine at position 223 (N₂₂₃), resulting in an increased reactivity with antisera derived from an animal exposed to a H5-subtype influenza virus. In a specific embodiment the HA molecule of the invention is not an A/HK/213/03 HA molecule, which is a naturally occurring H5-subtype with asparagine at position 223. The influenza virus may be a human
25 influenza A virus of the H5 subtype, including A/Vietnam/1203/04 (H5N1) virus.

[38] An amino acid changes that makes the HA molecule more antigenic can be made in the reception binding domain of HA, *e.g.*, as depicted in Figure 3A, particularly in the 220-loop region in the receptor binding domain. Such a change may reduce HA binding to sialic acid

receptors on red blood cells, thus increasing the ability of anti-HA antibodies to inhibit hemagglutination, resulting in amplification of the effect of antibody binding activity in a hemagglutination inhibition assay. Alternatively, an amino acid change that makes the HA molecule more antigenic can be made to alter or delete a glycosylation site on the HA protein, particularly a glycosylation site that masks epitopes on HA recognized by HA-specific antibodies. In still another embodiment, the amino acid change can be made to an amino acid residue corresponding to residue 223 of the H5 HA subtype. In all of the embodiments of the invention, amino acid modifications that make an HA molecule more antigenic can be readily identified by immunoassays using antibodies specific for the particular HA subtype. A modification that makes the HA molecule more antigenic will result in apparent higher titer antibody binding activity, relative to the binding activity with the HA molecule to which the antibodies were elicited. Such assays include hemagglutinin inhibition (HI) assays.

[39] In a specific embodiment, substitution in an H5-subtype HA molecule of a serine residue (which may be a glycosylated residue) with asparagine (which is either not glycosylated or differently glycosylated) results in increase antigenicity. However, other substitutions can also result in an apparent increased antigenicity. Such substitutions may be, but need not be, conservative, such as threonine for serine, or glutamine for asparagine. They may preserve the relative polarity, such as asparagine for serine, or lysine for aspartic acid, which conserves polarity without maintaining the same change. It is also contemplated to substitute with residues such as glycine and alanine that eliminate a reactive side chain without having a lot of effect on the polypeptide structure. Finally, completely non-conservative changes are possible. Again, simple immunoassays will indicate whether a particular change results in increased antigenicity.

[40] Some avian H5N1 viruses isolated in Central and South America have a basic amino acid, arginine, at position 223. The neutral amino acid asparagine at location 223 is found in the HA of the human isolate A/HK/213/03. This amino acid residue is located in the 220-loop of the receptor binding domain between the glutamine generally present at location 222 and the glycine generally present at location 224 (Fig. 3). The experimental evidence suggests that the higher HI titers reflect a change in receptor specificity. Indeed, the glutamine generally present at location 222 and the glycine generally present at location 224 bind directly to the sialic acid receptor.

46
17

Amino acids in the 220 loop or adjacent to it are important for the conformation of the receptor binding pocket (Ha *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2001, 98:11181). Although the present invention does not rely on any particular explanation of the observed effect, it is possible that substitution of asparagine for serine at position 223 of H5 results in conformational changes and altered receptor specificity.

[41] In a further aspect, HA molecules modified in accordance with the invention to be more antigenic are also more immunogenic. Such molecules can elicit a stronger or more potent immune response as a component of an influenza vaccine, which in turn results in greater protection against influenza infection.

[42] Influenza viruses originating from avian reservoirs are of particular concern to public health. These viruses are believed to be particularly likely to cause pandemic influenza outbreaks in humans. A HA molecule from an avian subtype with increased antigenicity and/or immunogenicity would therefore be particularly useful in immunoassays conducted in conjunction with vaccine development. The strategy exemplified herein with respect to H5 is useful in increasing HI (hemagglutinin inhibition) assay titers against other HA subtypes, and this is particularly useful for evaluating immunity to avian influenza. In some embodiments, the HA molecule with the amino acid substitution in the receptor binding site may be derived from an avian influenza virus, including subtypes H1 through H16 inclusively.

[43] One aspect of this invention includes the use of recombinant influenza virus that has an increased antigenicity HA molecule as a reference virus in an immunoassay, in particular a HI assay, including a kit for performing such an assay. For example, the amino acid substitution of asparagine at position 223 in the H5 HA molecule increases binding to red blood cell (RBC) sialic acid receptors with alpha 2,6 linkage, such as those from chickens, but decreased binding to receptors with a N-glycosyl sialic acid alpha 2,3 linkage, such as those from horse. Thus one aspect of the invention provides that the resultant lower binding on horse RBCs would require a smaller quantity of antibody to inhibit hemagglutination. This concept, of introducing amino acid substitutions that increase antigenicity, as measured by antibody binding, can be applied to all 16 HA subtypes, including those from avian influenza A viruses.

107
47

[44] The invention includes methods for determining the efficacy of an influenza virus vaccine in an animal. This method involves reacting antisera derived from the vaccinated animal with an influenza virus that has increased antigenicity hemagglutinin (HA) molecule. Some aspects of methods for determining the efficacy of an influenza virus vaccine in an animal, as demonstrated in the examples, include reacting antisera derived from the vaccinated animal with an influenza virus H5-subtype HA molecule containing the amino acid asparagine at position 223 (N₂₂₃), *e.g.*, the HA molecule from human H5N1 isolate A/HK/213/03. Asparagine at position 223 results in an increased reactivity with antisera derived from an animal exposed to a different H5 influenza virus. The vaccinated animal may be any one of a number of species, including ferrets and humans.

[45] Also included within this invention are methods for increasing the sensitivity of a HI assay by using a reference virus which includes an increased antigenicity HA molecule. In some embodiments, such as when HA molecule originates with a human H5N1 isolate of the A/HK/213/03 strain, the amino acid change is the presence of an asparagine at position 223, resulting in an increased reactivity with antisera derived from an animal exposed to an H5 influenza virus with a different amino acid residue at that position, such as A/Vietnam/1203/04. This increased reactivity may be of any level, including at least a 2-fold or at least a 4-fold increase in reactivity. A 2-fold or 4-fold increase in sensitivity could be especially significant in situations in which the endpoints of conventional titration methods are below the limit of detection.

[46] In a specific embodiment, the invention also includes using as a diagnostic reference virus a recombinant influenza virus that includes a modified H5-subtype HA molecule with the amino acid asparagine at position 223, resulting in an increased reactivity with antisera derived from an animal exposed to a H5 influenza virus. In a specific embodiment, the H5 HA molecule in the diagnostic reference virus originates with a human H5N1 isolate of strain A/HK/213/03. In another embodiment, an asparagine (or glutamine) is substituted in position 223 of an H5 molecule from another influenza strain. It is readily apparent that the same approach can be adapted to any HA molecule from any influenza strain. In various embodiments, the animal may be of a number of species, including ferrets and humans.

20
48

[47] In addition to the use of reference viruses with increased sensitivity in human vaccine clinical trials, these viruses can be used in seroepidemiology studies. The availability of data showing how many humans were infected with H5N1 viruses by rapid and simple detection methods like HI assays provides important information on the prevalence of H5N1 viruses in humans. This data can be used to assess the probability of H5N1 viruses spread from human-to human or between avian species and humans.

[48] Other aspects of the invention include methods for determining whether an animal has been exposed to an influenza virus by reacting antisera derived from the animal with a diagnostic reference virus. The diagnostic reference virus is derived from the same strain of influenza virus as the exposure virus, but the reference virus contains an increased antigenicity HA molecule. In one embodiment, the reference virus comprises an HA molecule with an asparagine at the position corresponding to position 223 in H5 HA, wherein the inclusion of asparagine results in an increased reactivity with antisera derived from an animal exposed to an influenza virus with a wildtype HA molecule, resulting in an increased reactivity with the antisera. In another embodiment, the reference virus comprises an influenza virus hemagglutinin (HA) molecule comprising an amino acid asparagine at the position corresponding to position 223 in H5 HA, and the HA molecule does not originate with human H5 isolate A/HK/213/03 and the inclusion of asparagine at position 223 results in an increased reactivity with antisera derived from an animal exposed to an influenza virus. In a specific embodiment, the contracted virus is an H5N1 virus and the reference virus is human H5N1 isolate A/HK/213/03, which includes asparagine at amino acid position 223, resulting in an increased reactivity with the H5N1-specific antisera. In different aspects of the invention, the animal may be of any species, including ferrets and humans.

[49] The invention also encompasses influenza vaccines including an increased antigenicity HA molecule. In a specific embodiment, the virus is a human H5N1 isolate. In a more specific embodiment, the HA is derived from A/HK/213/03. In still another embodiment, the HA is an H5 modified to include the amino acid asparagine at position 223.

[50] Introducing modifications in the HA molecule requires manipulation at the genetic level, as is well-known in the art, as explained in greater detail below. Once a modified HA gene is

24
49

prepared, a number of approaches are available, such as "reverse genetics" approaches, for introducing the modified HA molecule into an influenza virus, which can then become an reference virus for testing vaccine efficacy, or a diagnostic reference virus for following influenza epidemics, including animal-human virus spread and human-human virus spread.

5 [51] In some aspects, the invention includes recombinant influenza viruses comprising an influenza virus hemagglutinin (HA) molecule with at least one amino acid sequence change that makes the HA molecule more antigenic with respect to antibodies specific for HA molecules lacking the changes. The amino acid sequence change may include a substitution or deletion of one or more amino acids. The modified HA molecule may be derived from H5N1 influenza
10 virus in the genetic background of an influenza A virus. In some embodiments, the influenza A virus is a master strain virus. The recombinant viruses comprising a modified HA molecule that is more antigenic with respect to antibodies specific for HA molecules lacking the amino acid sequence change may be used as a diagnostic reference virus in a hemagglutinin inhibition (HI) assay. The recombinant virus may also be included in a hemagglutinin inhibition (HI) assay kit.

15 [52] In other aspects, the invention includes methods of making a virus comprising a hemagglutinin (HA) molecule. For example, one aspect of the invention is a method of making a virus containing an influenza virus hemagglutinin (HA) molecule with at least one amino acid sequence change that makes the HA molecule more antigenic with respect to antibodies specific for HA molecules lacking the changes. The method may include introducing a recombinant
20 vector that expresses modified HA in a reverse genetics system. A method for producing an influenza virus with a hemagglutinin (HA) molecule may include culturing a reverse genetics system in which DNA encoding HA encodes an amino acid substitution in the receptor binding site that makes the HA molecule more antigenic with respect to antibodies specific for the HA molecule lacking the amino acid substitution in the receptor binding site by a reverse genetics
25 process.

[53] Also included in the invention are methods for preparing nucleic acids encoding a hemagglutinin (HA) molecule. The HA molecule may contain at least one amino acid sequence change that makes the HA molecule more antigenic with respect to antibodies specific for HA molecules lacking the changes. In some embodiments, the method comprises introducing a

22
50

nucleotide sequence into a nucleic acid encoding the HA molecule lacking the amino acid substitution in the receptor binding site, which results in an amino acid substitution in the sequence of the HA molecule that makes the HA molecule more antigenic with respect to antibodies for the HA molecule lacking the amino acid substitution.

5

Definitions

[54] The term “influenza virus” is used herein to define a viral species of which pathogenic strains cause the disease known as influenza or flu.

[55] The term “master strain virus” refers to a viral strain is used in the construction of high growth or attenuated vaccine strains. These master strains typically contribute six gene segments to the vaccine virus (PB1, PB2, PA, NP, NA, M and NS). The master strain virus may be a strain that is also in use as a vaccine component, including virus strain A/PR/8/34.

[56] The term “polypeptide” refers to a polymer of amino acids and does not refer to a specific length of the product; thus, peptides, oligopeptides, and proteins are included within the definition of polypeptide. This term also does not refer to, or exclude, post- translational modifications of the polypeptide, for example, glycosylations, acetylations, phosphorylations, and the like.

[57] As used herein, “infectious” refers to the ability of a virus to replicate in a cell and produce viral particles. Infectivity can be evaluated either by detecting virus, *i.e.*, viral load, or by observing disease progression in the animal.

[58] An “individual” or “subject” or “animal”, as used herein, refers to vertebrates that support a negative strand RNA virus infection, specifically influenza virus infection, including, but not limited to, birds (such as water fowl and chickens) and members of the mammalian species, such as canine, feline, lupine, mustela, rodent (racine, murine, , etc.), equine, bovine, ovine, caprine, porcine species, and primates, the latter including humans. In a specific embodiment, the subject is a ferret, which is a good animal model for studying influenza. In another embodiment, the subject is a human.

23
51

[59] As used herein, the term “immunogenic” means that the virus or polypeptide is capable of eliciting a humoral or cellular immune response, and preferably both. An immunogenic entity is also antigenic. An immunogenic composition is a composition that elicits a humoral or cellular immune response, or both, when administered to an animal.

5 [60] A molecule is “antigenic” when it is capable of specifically interacting with an antigen recognition molecule of the immune system, such as an immunoglobulin (antibody) or T cell antigen receptor. An antigenic polypeptide contains an “epitope” of at least about five, and preferably at least about 10, amino acids. An antigenic portion of a polypeptide, also called
10 herein the “epitope”, can be that portion that is immunodominant for antibody or T cell receptor recognition, or it can be a portion used to generate an antibody to the molecule by conjugating the antigenic portion to a carrier polypeptide for immunization. A molecule that is antigenic need not be itself immunogenic, *i.e.*, capable of eliciting an immune response without a carrier.

[61] As used herein, the term “amino acid substitution” refers to the presence of an amino acid at a particular location in the amino acid sequence of that molecule. The amino acid substitution
15 occurs relative to any other amino acid that could have occupied that location. The polypeptide that results from the amino acid sequence change may include changes in post-translational modifications such as glycosylations, acetylations, phosphorylations or any other amino acid modifications as well as the amino acid substitution.

[62] The term “reverse genetics system” as used herein refers to methods of generating
20 influenza virus particles, polypeptides, virions or nucleic acids by genetic engineering methods. These methods include but are not limited to the “plasmid system” as described by Hoffmann (Hoffmann *et al.*, Vaccine 2002, 20:3165; US Patent Publication 2002/0164770A1, 7 November 2002, which is hereby incorporated by reference in its entirety.). Generally speaking, reverse genetics systems allow for the creation of virus particles, polypeptides, and/or nucleic acids with
25 specific sequences by genetic engineering methods known to those of skill in the art. These systems are also described in greater detail below.

[63] As used herein the term “receptor binding site” refers to the portion of the HA molecule where the receptor of interest, such as sialic acid receptor on a red blood cell, binds. The

24
52

structure of the H5 molecule of A/duck/Singapore, and the location of the receptor binding site for hemagglutinin of the H5 subtype, is known and described (Ha *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2001 98:11181). The molecular model of this H5 HA, including the receptor binding site, is shown in FIG 3.

5 [64] The term “diagnostic reference virus” refers to a virus with enhanced HA antigenicity. Such a diagnostic reference virus can be used in an immunoassay, *e.g.*, the hemagglutinin inhibition assay.

[65] The term “exposure virus” refers to a virus to which an individual animal has been exposed. This exposure can be in the course of daily activities, such as contact with an infected subject,
10 *e.g.*, leading to exposure of a human to an infectious influenza virus. The exposure can also be due to a specific clinical challenge, such as in a laboratory testing situation where a laboratory animal such as a ferret is intentionally exposed to a virus. Such exposure can be expressly generated through immunization with an influenza vaccine.

[66] The phrase “pharmaceutically acceptable” refers to molecular entities and compositions
15 that are physiologically tolerable and do not typically produce an allergic or similar untoward reaction, such as gastric upset, dizziness and the like, when administered to a human. Preferably, as used herein, the term “pharmaceutically acceptable” means approved by a regulatory agency of the Federal or a state government or listed in the U.S. Pharmacopeia or other generally recognized pharmacopeia for use in animals, and more particularly in humans.

20 [67] The term “carrier” refers to a diluent, adjuvant, excipient, or vehicle with which the compound is administered. Such pharmaceutical carriers can be sterile liquids, such as water and oils, including those of petroleum, animal, vegetable or synthetic origin, such as peanut oil, soybean oil, mineral oil, sesame oil and the like. Water or aqueous solution saline solutions and aqueous dextrose and glycerol solutions are preferably employed as carriers, particularly for
25 injectable solutions. Suitable pharmaceutical carriers are described in “Remington’s Pharmaceutical Sciences” by E.W. Martin, 18th Edition.

[68] As used herein, the term “adjuvant” refers to a compound or mixture that enhances the immune response to an antigen. An adjuvant can serve as a tissue depot that slowly releases the

25
53

antigen and also as a lymphoid system activator that non-specifically enhances the immune response (Hood, *et al.*, *Immunology, Second Ed.*, Menlo Park, CA: Benjamin/Cummings, 1984. p. 384). Often, a primary challenge with an antigen alone, in the absence of an adjuvant, will fail to elicit a humoral or cellular immune response. Adjuvants include, but are not limited to, complete Freund's adjuvant, incomplete Freund's adjuvant, saponin, mineral gels such as aluminum hydroxide, surface active substances such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil or hydrocarbon emulsions, keyhole limpet hemocyanins, and potentially useful human adjuvants such as N-acetyl-muramyl-L-threonyl-D-isoglutamine (thr-MDP), N-acetyl-nor-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine, N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanine-2-(1'-2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3-hydroxyphosphoryloxy)-ethylamine, BCG (*bacille Calmette-Guerin*) and *Corynebacterium parvum*. Preferably, the adjuvant is pharmaceutically acceptable.

[69] As used herein, the term "isolated" means that the referenced material is removed from its native environment, *e.g.*, a cell or virus. Thus, an isolated biological material can be free of some or all cellular components, *i.e.*, components of the cells in which the native material occurs naturally (*e.g.*, cytoplasmic or membrane component). A material shall be deemed isolated if it is present in a cell extract or supernatant. In the case of nucleic acid molecules, an isolated nucleic acid includes a PCR product, an isolated mRNA, a cDNA, or a restriction fragment. In another embodiment, an isolated nucleic acid is preferably excised from the chromosome in which it may be found, and more preferably is no longer joined or proximal to non-coding regions (but may be joined to its native regulatory regions or portions thereof), or to other genes, located upstream or downstream of the gene contained by the isolated nucleic acid molecule when found in the chromosome. In yet another embodiment, the isolated nucleic acid lacks one or more introns. Isolated nucleic acid molecules include sequences inserted into plasmids, cosmids, artificial chromosomes, and the like, *i.e.*, when it forms part of a chimeric recombinant nucleic acid construct. Thus, in a specific embodiment, a recombinant nucleic acid is an isolated nucleic acid. An isolated protein may be associated with other proteins or nucleic acids, or both, with which it associates in the cell, or with cellular membranes if it is a membrane-associated protein. An isolated organelle, cell, or tissue is removed from the anatomical site in which it is found in an organism. An isolated material may be, but need not be, purified.

86
54

[70] The term "purified" as used herein refers to material that has been isolated under conditions that reduce or eliminate the presence of unrelated materials, *i.e.*, contaminants, including native materials from which the material is obtained. For example, a purified virion is preferably substantially free of host cell or culture components, including tissue culture or egg proteins, non-specific pathogens, and the like. As used herein, the term "substantially free" is used operationally, in the context of analytical testing of the material. Preferably, purified material substantially free of contaminants is at least 50% pure; more preferably, at least 90% pure, and more preferably still at least 99% pure. Purity can be evaluated by chromatography, gel electrophoresis, immunoassay, composition analysis, biological assay, and other methods known in the art.

[71] Methods for purification are well-known in the art. Viral particles can be purified by ultrafiltration or ultracentrifugation, preferably continuous centrifugation (*see* Furminger, *supra*). Other purification methods are possible and contemplated herein. A purified material may contain less than about 50%, preferably less than about 75%, and most preferably less than about 90%, of the cellular components, media, proteins, or other nondesirable components or impurities (as context requires), with which it was originally associated. The term "substantially pure" indicates the highest degree of purity which can be achieved using conventional purification techniques known in the art.

[72] In a specific embodiment, the term "about" or "approximately" means within a statistically meaningful range of a value. Such a range can be within an order of magnitude, preferably within 50%, more preferably within 20%, more preferably still within 10%, and even more preferably within 5% of a given value or range. The allowable variation encompassed by the term "about" or "approximately" depends on the particular system under study, and can be readily appreciated by one of ordinary skill in the art.

25 Hemagglutinin

[73] Hemagglutinin (HA) is the major envelope glycoprotein of influenza A and B viruses. Hemagglutinin-esterase (HE) of influenza C viruses is the HA homologue in these viruses. New subtypes of HA molecules, typically introduced from aquatic birds, known to be the natural

reservoirs of influenza viruses, result in influenza pandemics (see Suzuki and Nei, Mol. Biol. Evol. 2002; 19(4): 501-509).

[74] HA contains two polypeptide chains, HA1 and HA2, encoded by a single gene and derived from proteolysis of a single precursor molecule, including loss of a signal peptide (Suzuki and Nei, *supra*; Air, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1981; 78(12): 7639-7643). HA1 has about 320 amino acids, and is receptor-binding protein and the major target of immune responses. HA2 has about 220 amino acids, and provides the anchor to the viral envelope (Suzuki and Nei, *supra*).

[75] HA genes from influenza A are classified into 16 subtypes, according to their antigenic properties. Influenza B and C virus HA (HE) genes are not classified into subtypes. The sequences of influenza subtypes H1 to H15, and influenza B and C HA (HE) are shown in Suzuki and Nei, *supra*, Figure 1, which is incorporated by reference. A comparison of the sequences of influenza A HA subtypes H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, and H12, including conserved amino acids residues from all twelve subtypes are shown in Figure 1 of Air, *supra*, which is incorporated by reference. Both references disclose the strains from which these sequences were obtained.

[76] New HA molecules of the invention are created by introducing changes to the amino acid sequence of HA molecule that results in increased antigenicity. Isolation of nucleic acids encoding such HA molecules is routine (*see Air, supra*), as is modification of the nucleic acid to introduce changes in the amino acid sequence, *e.g.*, by site-directed mutagenesis.

[77] In an alternative embodiment, HA molecules from one strain of a particular HA subtype already contain an amino acid sequence that increases their antigenicity relative to HA molecules of the same subtypes from a different strain, as exemplified herein with respect to A/HK/213/03, relative, *e.g.*, to A/Vietnam/1203/04. In this case, the influenza strain with the more antigenic HA molecule could serve as a diagnostic reference strain. In another embodiment, amino acid residues from the more antigenic HA can be introduced or substituted into the sequence of the less antigenic HA molecule to make it an increased antigenicity HA molecule.

[78] Various changes in the sequence of an HA molecule can result in increased antigenicity. As noted above, the HA1 chain, which is the reception binding domain and major target of

immune response is the chain in which such changes can be made. The changes can increase antibody affinity for the HA molecule, *e.g.*, by eliminating a glycosylation site that makes an epitope, or by favoring a conformation with enhanced antibody binding affinity. Alternatively, the change can result in decreased binding to HA receptor, *e.g.*, a sialic acid receptor on a red blood cell, making antibodies specific for the HA molecule more effective competitors for the hemagglutinin reaction. The various immunoassays capable of demonstrating these changes, including the hemagglutinin inhibition (HI) assay, are well-known in the art.

[79] The HI assay involves whole influenza virus particles, as do the current vaccines. Thus, the invention provides for influenza viruses with increased antigenicity HA molecules. Such viruses are most conveniently generated through a "reverse genetics" approach, although it is also possible to use classical reassortment as well.

Reverse Genetics Methods

[80] Recently developed reverse-genetics systems have allowed the manipulation of the influenza viral genome (Palese *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996, 93:11354; Neumann and Kawaoka, Adv. Virus Res. 1999, 53:265; Neumann *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 96:9345; Fodor *et al.*, J. Virol. 1999, 73:9679; US Patent Application 20040029251). For example, it has been demonstrated that the plasmid-driven expression of eight influenza vRNAs from a pol I promoter and all mRNAs from a polII promoter result in the formation of infectious influenza A virus (Hoffmann *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2000, 97:6108; US Patent Publication No. 20020164770, which is incorporated by reference for its description of a minimal plasmid reverse genetics system, and for its description of genetic engineering methods). These recombinant methods allow for the specific production of influenza virus types with specific alterations to the polypeptide amino acid sequence. A HA molecule containing a desired substitution may be part of a recombinant influenza virus. The recombinant influenza virus may be made by any means known to those of skill in the art, including through a genetic engineering method such as the "plasmid only" system (Hoffmann *et al.*, Vaccine 2002, 20:3165). The recombinant influenza virus may be derived from a H5N1 virus. The recombinant virus may have the genetic background of a H1N1 virus used in vaccine development such as A/PR/8/34 virus or any influenza A virus, including cold-adapted strains of

A/Leningrad/134/17/57, A/Leningrad/134/47/57 and A/Ann Arbor/6/60. The nucleic acid corresponding to the HA molecule sequence may be isolated from the virus and sequenced.

[81] Techniques to isolate and modify specific nucleic acids and proteins are well known to those of skill in the art. In accordance with the present invention there may be employed conventional molecular biology, microbiology, and recombinant DNA techniques within the skill of the art. Such techniques are explained fully in the literature. See, e.g., Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 (herein "Sambrook *et al.*, 1989"); *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volumes I and II (D.N. Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* [B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)]; *Transcription And Translation* [B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984)]; *Animal Cell Culture* [R.I. Freshney, ed. (1986)]; *Immobilized Cells And Enzymes* [IRL Press, (1986)]; B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); Ausubel, F.M. *et al.* (eds.). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., 1994. These techniques include site directed mutagenesis employing oligonucleotides with altered nucleotides for generating PCR products with mutations (e.g., the "Quikchange" kit manufactured by Stratagene).

Immunoassays

[82] Various means known in the art for detecting immunospecific binding of an antibody to an antigen can be used to detect the binding and increased antigenicity in accordance with the present invention. An early method of detecting interaction between an antigen and an antibody involved detection and analysis of the complex by precipitation in gels. A further method of detecting an analyte-detector antibody binding pair includes the use of radioiodinated detector antibodies or a radioiodinated protein which is reactive with IgG, such as Protein A. These early methods are well known to persons skilled in the art, as reviewed in *Methods in Enzymology* 1980, 70:166-198.

[83] Later methods for determining the presence of an analyte in a sample using only one antibody include competitive binding assays. In this technique the antibody, which most often would be immobilized onto a solid support, would be exposed to a sample suspected of containing the analyte together with a known quantity of labeled analyte. The two analytes, the

30
58

labeled analyte and the analyte in the sample, would then compete for binding sites on the antibody. Either free labeled analyte or bound labeled analyte is determined and from this measurement the amount of competing analyte in the sample is known. A more complete description of this method is disclosed in "Basic Principles of Antigen-Antibody Reaction" (Labat, Methods in Enzymology, 70, 3-70, 1980). In this example the labeled analyte can be labeled with either a radioisotope or an enzyme label.

[84] More current immunoassays utilize a double antibody method for detecting the presence of an analyte. These techniques are also reviewed in the above referenced volume of Methods in Enzymology. Therefore, according to one embodiment of the present invention, the presence of the individual markers is determined using a pair of antibodies for each of the markers to be detected. One of said pairs of antibodies is referred to herein as a "detector antibody" and the other of said pair of antibodies is referred to herein as a "capture antibody". One embodiment of the present invention thus uses the double antibody sandwich method for detecting an analyte in a sample of biological fluid. In this method, the analyte is sandwiched between the detector antibody and the capture antibody, the capture antibody being irreversibly immobilized onto a solid support. The detector antibody would contain a detectable label, in order to identify the presence of the antibody-analyte sandwich and thus the presence of the analyte.

[85] Common early forms of solid supports include plates, tubes or beads of polystyrene, all of which are well known in the field of radioimmunoassay and enzyme immunoassay. More recently, a number of porous materials such as nylon, nitrocellulose, cellulose acetate, glass fibers, and other porous polymers have been employed as solid supports.

[86] Various techniques and corresponding sensor devices may be used. Automated assay apparatuses include continuous/random access assay apparatus. Examples of such systems include OPUS™ of PB Diagnostic System, Inc. and the IMX™ Analyzer introduced by Abbott Laboratories of North Chicago, Ill. The automated assay instruments of PB Diagnostic Systems, Inc. are described in U.S. Pat. Nos. 5,051,237; 5,138,868; 5,141,871 and 5,147,609.

[87] Further classes of immunochemical analyzer systems, which can be used in practicing the present invention, are optical immunosensor systems. In general an optical immunosensor is a

34
59

device that uses optical principles quantitatively to convert chemical or biochemical concentrations or activities of interest into electrical signals. These systems can be grouped into four major categories: reflection techniques; surface plasmon resonance; fiber optic techniques and integrated optic devices. Reflection techniques include ellipsometry, multiple integral
5 reflection spectroscopy, and fluorescent capillary fill devices. Fiber-optic techniques include evanescent field fluorescence, optical fiber capillary tube, and fiber optic fluorescence sensors. Integrated optic devices include planer evanescent field fluorescence, input grading coupler immunosensor, Mach-Zehnder interferometer, Hartman interferometer and difference interferometer sensors. Holographic detection of binding reactions is accomplished detecting the
10 presence of a holographic image that is generated at a predetermined image location when one reactant of a binding pair binds to an immobilized second reactant of the binding pair (see U.S. Pat. No. 5,352,582, issued Oct. 4, 1994 to Lichtenwalter *et al.*). Examples of optical immunosensors are described in general in a review article by G. A. Robins, *Advances in Biosensors* 1991, 1:229-256. More specific descriptions of these devices are found for example
15 in U.S. Pat. Nos. 4,810,658; 4,978,503; and 5,186,897; R. A. Brady *et al.* (*Phil. Trans. R. Soc. Land. B.* 1987, 316:143-160) and G. A. Robinson *et al.* (*in Sensors and Actuators*, Elsevier 1992).

[88] Serological assays are widely used in the determination of influenza diagnosis as well as in research studies regarding the epidemiology and antigenicity of viral strains. In particular, the
20 hemagglutinin inhibition (HI) assay is widely used due to its minimal laboratory requirements and ease of use. It is contemplated that the invention will improve the applicability of the HI assay by increasing its sensitivity. The HI assay may also be used to show the antigenicity of the modified HA molecule, and assist in the characterization of the modified HA molecule as more or less antigenic than non-modified molecules.

25 [89] The HI assay determines the ability of antibodies from a serum sample to bind with a standardized reference. In the HI assay, serial dilutions (titers) of serum sample are mixed with standard amounts of erythrocytes and their association into complexes is detected visually. The lowest level of titrated serum that results in a visible complex is the assay result.

[90] As noted above, the present invention provides for improved production and validation of vaccines for treating or preventing influenza viral infections. In particular, the instant invention is applicable to vaccines made using reverse genetic techniques. It is contemplated that the invention will be of use in the validation and verification of the immune response after vaccination. In particular, but not exclusively, the invention provides for the enhanced detection of antibodies after an individual has been exposed to an influenza virus because of the enhanced antigenicity of the modified HA molecule. This enhanced antigenicity is reflected in the increased sensitivity of the assay used to detect the immune response, such as the HI assay.

Vaccine Development

[91] As exemplified below, a modified virus containing an increased antigenicity HA molecule itself is more immunogenic, which in turn provides for a stronger immune response and better vaccine potential.

[92] Strategies to enhance influenza vaccine effectiveness include the use of adjuvants (Wood and Williams, *supra*), co-administration of immunostimulatory molecules (Salgaller and Lodge, J. Surg. Oncol. 1998, 68:122) and mucosal vaccination strategies. Mucosal immunization strategies include encapsulating the virus in microcapsules (U.S. Patents No. 5,075,109, No. 5,820,883, and No. 5,853,763) and using an immunopotentiating membranous carrier (WO 98/0558). In addition, the immunogenicity of orally administered immunogens can be enhanced by using red blood cells (rbc) or rbc ghosts (U.S. Patent No. 5,643,577), or by using blue tongue antigen (U.S. Patent No. 5,690,938). Although these approaches are promising for improved future vaccination strategies, their use in specific situations requires validation and surveillance to ensure vaccine effectiveness. It is contemplated that the invention described herein will enhance these strategies including by increasing the ability to detect their immunogenic effects.

25

EXAMPLES

[93] The following examples illustrate various aspects of the invention, but are not intended to limit it.

33
61**Example 1: Serum antibody titers of inoculated ferrets**

[94] Highly pathogenic H5N1 viruses were obtained from World Health Organization (WHO) collaborating laboratories in Asia. All work with these viruses was performed in BL3+ facilities at St. Jude Children's Research Hospital. To compare the immunogenicity of the 2003 influenza viruses of Z genotype, which became dominant in 2004, with that of the 2004 viruses, we inoculated ferrets with the H5N1 virus isolated from a fatal human case (A/HK/213/03) (Guan *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2004, 101:8156) and with four H5N1 viruses isolated from humans, chickens, and falcons in 2004 (Fig. 1A). Male and female outbred ferrets were obtained through a special breeding program of the Animal Resources Center at St. Jude Children's Research Hospital. Animals were 3-5 months old and were seronegative by HI tests for exposure to currently circulating influenza A H1N1, H3N2, and H5N1 viruses and influenza B viruses. Viruses were propagated in the allantoic cavities of 10-day-old embryonated chicken eggs at 35°C for 48 h. Allantoic fluid harvested after a single passage in embryonated chicken eggs was frozen at -80°C and used in experiments. Serum antibodies were titrated by HI assay with challenge viruses 28 days after inoculation. A/HK/213/03 virus induced high antibody titers (1:640-1:1280), whereas the four 2004 strains induced very low HI titers (1:20-1:40).

[95] The relatively low HI titers to the 2004 H5N1 viruses could have been the result of virus-induced general immune suppression. However, the results of vaccination with Δ H5N1-A/PR/8/34 (6+2) vaccines that included the HA and neuraminidase of A/HK/213/03 and of A/Vietnam/1203/04 indicated that differences in the H5 could be a major contributor to this effect (Fig. 1B). Vaccination with two separate 7 μ g doses of Δ H5N1/03 vaccine induced high levels of serum antibodies detectable in both HI and virus neutralization tests (Fig. 1B). After identical vaccination with Δ H5N1/04, very low (approximately 1:20) titers were detected in the HI test, whereas neutralizing titers were much higher (about half that induced by Δ H5N1/03). Previous studies found that inactivated vaccine derived from A/duck/Singapore/3/97 (H5N3) induced little or no detectable serum antibody (Nicholson *et al.*, Lancet 2001, 357:1937; Stephenson *et al.*, Vaccine 2003, 21:1687). Taken together, these results indicate that some H5 isolates may have unusual immunogenic and/or antigenic properties. Alignment of the H5 amino acid sequences revealed that the HAs of A/HK/213/03 and A/Vietnam/1203/04 viruses differ in

34
62

10 amino acids in the HA1 region (Table 1b). A/Vietnam/1203/04 virus has a potential glycosylation site at asparagine N₁₅₄ (N₁₅₄-S₁₅₅-T₁₅₆, N-X-S/T, X≠ P). Sequence comparison revealed three amino acids (S₁₂₀, K₁₈₉, and S₂₂₃) that were present in all of the 2004 viruses but were not present in A/HK/213/03. K₂₁₂ was characteristic for A/Vietnam/1203/04 virus.

5 **Example 2: Generation and antigenic characterization of recombinant Δ H5- A/PR/8/34 viruses**

[96] To test the impact of the identified amino acids on immunogenicity and protection against virus challenge, we used the 8-plasmid reverse genetics system to generate recombinant viruses with seven gene segments of A/PR/8/34 and the HA gene segment of A/Vietnam/1203/04 containing single point mutations (Hoffmann *et al.*, Vaccine 2002, 20:3165). Recombinant viruses rendered nonpathogenic by modification of H5 HA at the cleavage site were generated by DNA transfection (Hoffmann *et al.*, Vaccine 2002, 20:3165). Point mutations were inserted into the HA during PCR by using the QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Cedar Creek, TX, USA) and a set of H5 HA-specific primers. Reassortant viruses contained the HA gene or the HA and neuraminidase (NA) genes from H5N1 viruses in the genetic background of A/PR/8/34 (H1N1) virus (see Table 1a for viruses generated for this study and their abbreviated names). Allantoic fluid harvested after a single passage in embryonated chicken eggs was frozen at -80°C and used in experiments. The HA genes of the recombinant viruses were amplified by RT-PCR and sequenced to verify that only the designated mutations were present. The amino acid change was verified by sequencing the HA segment of the recombinant viruses (Table 1a).

[97] To evaluate the antigenic properties and diversity of the recombinant HAs, we performed HI assays with a panel of six anti-HA monoclonal antibodies (Table 2). Monoclonal antibodies (mAbs) CP24, CP46, CP58, and 406/7 to the HA of A/chicken/Pennsylvania/1370/83 (H5N3) virus were produced in the Infectious Diseases Department of St. Jude Children's Research Hospital. MAb VN04-6 to the HA of A/Vietnam/1203/04 virus and mAb HK03-3 to the HA of A/HK/213/03 virus were prepared by a modification of the method described by Kohler and Milstein (Kaverin *et al.*, Journal of Virology 2004, 78:240; Koher *et al.*, European Journal of Immunology 1976, 6:511). Five mAbs reacted at relatively high titers with the Δ H5N1/03 virus,

38
63

but only 3 reacted with $\Delta H5/04$ HA. The reactivity patterns of $\Delta H5_{S155 \rightarrow N, T156 \rightarrow A}/04$, $\Delta H5_{S120 \rightarrow N}/04$ and $\Delta H5_{R212 \rightarrow K}/04$ viruses were similar, in general, to that of $\Delta H5/04$ virus. The reactions of $\Delta H5_{S120 \rightarrow N, S155 \rightarrow N, T156 \rightarrow A}/04$ virus were similar to those of $\Delta H5N1/03$ virus. Four mAbs recognized $\Delta H5/04$ HA with mutation $S_{223} \rightarrow N$ ($\Delta H5_{S223 \rightarrow N}/04$). The reverse mutation
5 $N_{223} \rightarrow S$ in the HA of 2003 virus ($\Delta H5_{N223 \rightarrow S}/03$) resulted in significantly decreased HI titers or loss of recognition by mAbs.

Example 3: HI tests with chicken and horse red blood cells

[98] Another interesting observation was obtained in an HI test with chicken and horse red blood cells (RBCs). Interestingly, recombinant $\Delta H5_{S223 \rightarrow N}/04$ virus were less able to agglutinate
10 1% horse RBCs but it agglutinated chicken RBCs to a high titer (1:1024). None of the remaining recombinant viruses differed in their reaction to chicken and horse RBCs to the same extent.

Example 4: Vaccination of ferrets with H5-mutant recombinant viruses

[99] We assessed the immunogenicity and protective efficacy of the inactivated vaccines by vaccinating groups of 3 ferrets by intramuscular injection with preparations of $\Delta H5N1/04$,
15 $\Delta H5/04$, $\Delta H5_{S155 \rightarrow N, T156 \rightarrow A}/04$, $\Delta H5_{S120 \rightarrow N}/04$, and $\Delta H5_{S223 \rightarrow N}/04$ virus standardized for HA content. The single radial immunodiffusion technique was used to standardize $\Delta H5N1/03$ (Webby *et al.*, Lancet 2004, 363:1099). The remaining recombinant viruses were separated by 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, the stained gels were analyzed by densitometry on the FUJIFILM Luminescent Image Analyzer LAS-1000plus, and HA was quantified by
20 comparison with a reference protein preparation. After receiving two injections of 7 μg HA, each animal was inoculated with A/Vietnam/1203/04 (H5N1). Groups of 3 ferrets were vaccinated by intramuscular injection of 250 μl sterile PBS containing 7 μg of HA from inactivated purified viruses. Vaccine viruses were inactivated, concentrated, purified as described (Liu *et al.*, Virology 2003, 314:580; Webby *et al.*, Lancet 2004, 363:1099). Three
25 control animals were injected with 250 μl of sterile PBS alone. On day 21 after vaccination, serum was collected and a second intramuscular injection of 7 μg HA was given. Two weeks later, serum was again collected and animals were inoculated with challenge virus.

3664

[100] Vaccinated and control animals were inoculated intranasally as previously described with 10⁶ 50% egg infective doses (EID₅₀) of A/Vietnam/1203/04 virus (Govorkova *et al.*, Journal of Virology 2005, 79:2191). Clinical signs of infection, body weight, and temperature were monitored daily for two weeks. Ferrets that showed signs of severe disease were sacrificed. To
5 estimate the post-infective immune response, additional groups of ferrets were inoculated with 10⁶ EID₅₀ of the human and avian H5N1 isolates A/HK/213/03, A/Vietnam/3046/04, A/Vietnam/3062/04, A/chicken/Vietnam/39/04, and A/falcon/HK/D0028/04. Sera were collected from the animals on day 28 after inoculation. In order to determine virus titers in the upper respiratory tract, specimens were obtained by nasal lavage on days 3, 5, and 7 (Govorkova
10 *et al.*, Journal of Virology 2005, 79:2191). Virus in the samples was titrated in 10-day-old embryonated chicken eggs and expressed as log₁₀ EID₅₀ per 0.1 ml. Nasal washes of all vaccinated animals showed virus titers of 2.5-4.5 log₁₀ EID₅₀ on day 3, 0.5- 2.5 log₁₀ EID₅₀ on day 5, and 0.25 log₁₀ EID₅₀ or less on day 7 (Fig. 2). Unvaccinated ferrets had a mean titer of 4.0 log₁₀ EID₅₀ one week after infection. Two of the 3 control ferrets developed signs of severe
15 disease (massive weight loss and paralysis) and were euthanized, and one died of infection. Only one vaccinated ferret became seriously ill. This ferret, vaccinated with ΔH5_{S120→N}/04 virus, showed severe neurological signs and was euthanized on day 7 after inoculation. This ferret had shown severe viral conjunctivitis on day 4 after inoculation, with subsequent virus spread to the brain. It is likely that virus was transferred to the eyes during the nasal lavage on
20 day 3 and that rapid neuronal spreading to the brain caused encephalitis. The remaining vaccinated ferrets demonstrated decreased activity, loss of body weight, and increased body temperature during the first 3 days after virus challenge. These signs disappeared by day 5 and all animals recovered rapidly. Thus, all vaccine viruses tested protected ferrets from lethal challenge with A/Vietnam/1203/04. Vaccination decreased viral titers in the upper respiratory
25 tract and decreased the duration of virus shedding.

Example 5: HI and neutralization tests of the immunogenicity of recombinant ΔH5-A/PR/8/34 viruses

[101] Serum from vaccinated ferrets was tested against the recombinant viruses in HI and virus neutralization assays (Tables 3 and 4, respectively). Sera collected from ferrets were treated

overnight with *Vibrio cholerae* receptor-destroying enzyme (Denka-Seiken, Tokyo, Japan), heat-inactivated at 56°C for 30 min, and adsorbed with a 0.5% suspension of chicken erythrocytes (CRBC). Standard HI and virus neutralization tests in MDCK cells were performed as described previously (Palmer *et al.*, US Department of Health, Education and Welfare, Immunology series no. 6. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention. 1975; Kida *et al.*, Virology 1982 122:38).

[102] Four hemagglutinating units (HAU) of virus were used in each HI assay and 100 50% tissue culture infective doses (TCID₅₀) were used in each neutralization assay. Sera from ferrets vaccinated with the wild-type single-gene reassortant virus (Δ H5/04, reference virus) produced HI titers of 1:20. The construct in which the glycosylation site was removed (Δ H5_{S155→N; T156→A}/04) induced HI titers of 1:10-1:20. Mutant Δ H5 HA_{S120→N}/04 resulted in HI titers of 1:20 to 1:80. In contrast, vaccination with Δ H5_{S223→N}/04 resulted in an HI titer of 1:640, and the other immune sera tested reacted with Δ H5_{S223→N}/04 virus at high HI titers (1:160 to 1:320). Thus, although the vaccination induced protective immunity, the levels of detectable antibody were different.

[103] All Δ H5/04 viruses produced high titers of virus-neutralizing antibodies after vaccination (1:320 to 1:1280) (Table 4). No substantial differences were observed between homologous and heterologous neutralizing titers. Therefore, the differences observed between the antisera in recognition of the HA did not reflect the ability of the antibodies to neutralize virus.

Example 6: Reactivity of recombinant viruses

[104] To further evaluate the reactivity of the recombinant viruses, we used HI assays to test hyperimmune mouse and chicken serum obtained after vaccination with the Δ H5N1/03 and A/HK/213/03 viruses against recombinant viruses with altered HAs (Table 5). The mean HI titers to homologous Δ H5N1/03 virus were 1:2560. HI titers to Δ H5/04 were 1:160. HI titers against recombinant Δ H5_{S223→N}/04 virus were at least twice the titers against the other mutants.

[105] To obtain additional information about the contribution of the amino acid at position 223 to serological reactivity, we generated a recombinant virus in which the H5 was derived from A/HK/213/03, with only the N₂₂₃→S point mutation (Table 1a). This recombinant Δ H5_{N223→S}/03

37
66

virus had lower HI titers in chicken and horse RBCs than did the Δ H5N1/03 virus. To further characterize the impact of amino acid 223 on antigen-antibody recognition, we generated recombinant viruses that contained wild-type HA and mutated S₂₂₃→N HA from A/duck/Singapore/3/97 (see Table 1a). These viruses were tested by HI assay against a panel of
5 anti-H5 antisera and mAbs (Table 6). The S₂₂₃→N substitution in the HA dramatically increased the HI titers (by a factor of 4 or more). However, this mutation did not significantly alter the reactivity pattern of A/duck/Singapore/3/97 HA, especially in the reactions with mAbs: neither the original nor the mutant HA reacted with mAbs HK03-3 and CP46, and both reacted at a low titer with CP46 (Table 6). These results demonstrate that the S₂₂₃→N substitution in HA
10 increases the sensitivity of the HI assay.

Example 7: Second generation diagnostic reference viruses that are predicted to increase the sensitivity of the HI assay

[106] We have previously demonstrated in Example 3 above that by converting the amino acid at position 223 of H5 HA to asparagine the sensitivity of the HI test using chicken red blood cells
15 was increased. We have provided evidence that the molecular basis of this effect was caused by an altered receptor specificity. The mutant virus with increased sensitivity did not agglutinate horse red blood cells which have only alpha 2,3 linkage. Thus, amino acid changes that result in the inability to agglutinate horse red blood cells are candidates with increased sensitivity potential in the HI assay using chicken red blood cells. This concept can be applied to all 16 HA
20 subtypes, especially avian influenza A viruses which have 2,3 specificity.

[107] Reverse genetics techniques allow for the generation of recombinant viruses which have minor changes in their antigenic structures but are 'optimized' in recognition of different cell substrates. Preferably amino acids (91, 130-134, 149, 151, 179, 186, 190-191, 220-225 for H5) are mutated that are close to or part of the receptor binding site. Plasmids with genetically
25 engineered HAs may be constructed and viruses may be generated by cotransfection. The recombinant viruses may be tested by HA assays using chicken red blood cells and horse red blood cells in parallel. Candidate viruses that do agglutinate chicken red blood cells but do not agglutinate horse red blood cells will be candidates for testing in HI tests. In complementary experiments viruses are generated that agglutinate horse red blood cells but do not agglutinate

67
39

WO 2007/019094

PCT/US2006/029575

chicken red blood cells The combination of candidates with single amino changes may increase the sensitivity further. It is expected that the evaluation of the candidates will lead to diagnostic reference viruses with specific reactivity to receptors with 2,3 specificity.

68
40

Table 1a. Recombinant H5-PR/8/34 viruses generated for use in this study.

Recombinant virus:		Amino acid position in HA1											
Full name	Abbreviation	36	83	86	120	155	156	189	212	223	263		
A/HK/213/03 ΔH5N1 x PR/8/34	ΔH5N1/03	T	A	A	N	N	A	R	K	N	A		
A/Vietnam/1203/04 ΔH5N1 x PR/8/34	ΔH5N1/04	K	T	V	S	S	T	K	R	S	T		
A/Vietnam/1203/04 ΔH5 x PR/8/34	ΔH5/04	K	T	V	S	S	T	K	R	S	T		
A/Vietnam/1203/04 ΔH5 _{S155→N} , T156→A x PR/8/34	ΔH5 _{S155→N} , T156→A/04	T	A	V	S	N	A	K	R	S	T		
A/Vietnam/1203/04 ΔH5 _{S120→N} x PR/8/34	ΔH5 _{S120→N} /04	T	A	V	N	S	T	K	R	S	T		
A/Vietnam/1203/04 ΔH5 _{R212→K} x PR/8/34	ΔH5 _{R212→K} /04	T	A	V	S	S	T	K	K	S	T		
A/Vietnam/1203/04 ΔH5 _{S223→N} x PR/8/34	ΔH5 _{S223→N} /04	T	A	A	S	S	T	K	R	N	A		
A/Vietnam/1203/04 ΔH5 _{S120→N} , S155→N, T156→A x PR/8/34	ΔH5 _{S120→N} , S155→N, T156→A/04	T	A	A	N	N	A	K	R	S	A		
A/HK/213/03 ΔH5 _{N223→S} x PR/8/34	ΔH5 _{N223→S} /03	T	A	A	N	N	A	R	K	S	A		
A/duck/Singapore/3/97 H5 x PR/8/34	H5/97 [†]	T	D	V	S	N	A	K	E	S	A		
A/duck/Singapore/3/97 H5 _{S123→N} x PR/8/34	H5 _{S123→N} /97	T	D	V	S	N	A	K	E	N	A		

*: Δ multibasic amino acids in the H5 were removed by genetic engineering.

†: Wild-type A/duck/Singapore/3/97 does not have multibasic amino acids.

69

Table 1b. Sequence differences in the HA1 protein of H5N1 influenza viruses.

Virus	Amino acid position in HA1										
	36	83	86	120	155	156	189	212	223	263	
A/HK/213/03	T	A	A	N	N	A	R	K	N	A	
A/Vietnam/1203/04	K	T	V	S	S	T	K	R	S	T	
A/Vietnam /3046/04	T	A	V	S	S	T	K	R	S	T	
A/Vietnam /3062/04	T	A	V	S	S	T	K	R	S	T	
A/chicken/Vietnam /39/04	T	A	V	S	S	T	K	R	S	T	
A/falcon/HK-D0028/04	T	A	A	S	S	A	K	K	S	A	
A/duck/Singapore/3/97	T	D	V	S	N	A	K	E	S	A	
A/HK/156/97	T	A	A	S	S	A	K	E	S	T	

42
70

Table 2. HI analysis of ΔH5 recombinant viruses with anti-H5 monoclonal antibodies

Virus	Monoclonal antibodies to H5 (HI titers)					
	VN04-6*	HK03-3†	CP24‡	CP46‡	CP58‡	406/7‡
ΔH5N1/03	51200	6400	1600	100	1600	800
ΔH5/04	12800	<100	800	<100	1600	<100
ΔH5 _{S155→N} , T156→A/04	3200	<100	800	<100	800	100
ΔH5 _{S120→N} /04	12800	200	800	<100	1600	<100
ΔH5 _{R212→K} /04	12800	100	1600	<100	6400	<100
ΔH5 _{S223→N} /04	51200	3200	12800	<100	25600	<100
ΔH5 _{S120→N} , S155→N, T156→A/04	12800	1600	3200	<100	1600	200
ΔH5 _{N223→S} /03	12800	800	≤100	<100	200	≤100

HI tests were performed in microtiter plates with 0.5% chicken RBCs. Titers are the reciprocal lowest dilutions of mAbs that inhibited hemagglutinin caused by 4 hemagglutinating units (HAU) of virus.

* anti-HA mAb to A/Vietnam/1203/04 virus;

† anti-HA mAb to A/HK/213/03 virus;

‡ anti-HA mAb to A/chicken/Pennsylvania/1370/83 virus.

43
71

Table 3. Immunogenicity of A/Vietnam/1203/04 ΔH5 HA recombinant viruses in ferrets.

Virus	HI titer of sera after immunization with:											
	ΔH5/04			ΔH5 _{S155→N} , T156→A/04			ΔH5 _{S120→N} /04			ΔH5 _{S223→N} /04		
ΔH5N1/03	20	20	10	160	80	160	20	20	10	20	10	10
ΔH5/04	<u>20</u>	<u>20</u>	<u>20</u>	20	20	20	20	20	20	20	20	20
ΔH5 _{S155→N} , T156→A/04				<u>20</u>	<u>10</u>	<u>20</u>						
ΔH5 _{S120→N} /04							<u>80</u>	<u>80</u>	<u>20</u>			
ΔH5 _{S223→N} /04	160	320	320	160	320	160	320	320	320	<u>640</u>	<u>640</u>	<u>640</u>

5 Eleven-week-old influenza-seronegative ferrets were vaccinated twice at 3-week intervals by intramuscular injection of inactivated, purified and concentrated virus preparation containing 7 μg HA in 250 μl of PBS. Data are the HI titers from 3 ferrets presented individually. HI tests used 0.5% chicken RBCs.

44
72

Table 4. Virus-neutralization titers of ferret sera after vaccination with viruses containing the modified HA of A/Vietnam/1203/04 virus.

Virus	Neutralizing antibody titers after immunization with:												
	Δ H5N1/04			Δ H5/04			Δ H5 _{S155→N, T156→A} /04			Δ H5 _{S223→N} /04			mock
Δ H5N1/03	1280	1280	320	640	320	640	1280	1280	320	640	640	640	<80
Δ H5N1/04	<u>2560</u>	<u>1280</u>	<u>640</u>	1280	640	640	1280	1280	640	640	1280	1280	<80
Δ H5/04	1280	1280	640	<u>1280</u>	<u>640</u>	<u>640</u>	1280	1280	640	640	1280	1280	<80
Δ H5 _{S155→N, T156→A} /04	1280	1280	640	1280	640	640	<u>1280</u>	<u>1280</u>	<u>640</u>	1280	1280	1280	<80
Δ H5 _{S223→N} /04	1280	1280	1280	1280	1280	640	1280	1280	320	<u>1280</u>	<u>1280</u>	<u>1280</u>	<80
Δ H5 _{S223→N} N1/04	1280	1280	640	1280	640	640	1280	1280	640	1280	1280	1280	<80

5 Neutralization assay was performed in MDCK cells. Titers are the reciprocal lowest dilutions of sera that completely inhibited 100 TCID₅₀ of virus. Homologous titers are underlined. Values are the neutralizing titers from 3 ferrets presented individually.

45
73

Table 5. HI testing of antisera to 2003 H5N1 against mutant viruses

Polyclonal antiserum to:		
Virus	vaccine Δ H5N1/03	A/HK/213/03 (H5N1)
Δ H5N1/03	2560	2560
Δ H5/04	160	160
Δ H5 _{S155→N; T156→A}	80	320
Δ H5 _{S120→N} /04	320	320
Δ H5 _{S223→N} /04	1280	640

HI test was performed in microtiter plates with 0.5% chicken RBCs (Palmer *et al.*,
5 in *US Department of Health, Education and Welfare, Immunology series no. 6*.
Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 1975). Titers are the
reciprocal lowest dilutions of sera that inhibited hemagglutinin caused by 4 HAU
of virus.

74
46

Table 6. Antigenic analysis of H5/97 and H5_{S223-N}/97 viruses with polyclonal and monoclonal antibodies.

Virus	HI titer of polyclonal antisera:					HI titer of mABs:						
	A/ck/Hid algo/94	A/HK/15 6/97	A/Gs/HK /497-4/97	A/ck/HK/ YU22/02	A/HK/21 3/03	ΔH5/03	VN04-6*	HK03-3 [†]	CP58 [‡]	CP24 [‡]	CP46 [‡]	CP406/7 [‡]
ΔH5/03	20	320	5120	12 800	160	5 120	25 600	6 400	1 600	12 800	<100	1 600
H5/97	40	640	640	320	<10	10	3 200	<100	3 200	1 600	<100	3 200
H5 _{S223→N} /97	320	10 240	10 240	2 560	80	1 280	25 600	<100	25 600	51 200	200	25 600

* anti-HA mAb to A/Vietnam/1203/04 virus;

[†] anti-HA mAb to A/HK/213/03 virus;

[‡] anti-HA mAb to A/chicken/Pennsylvania/1370/83 virus.

HI test was performed in microtiter plates with 0.5% chicken RBCs (14). Titers are the reciprocal lowest dilutions of sera that inhibited hemagglutinin caused by 4 HAU of virus.

47
78

[108] The present invention is not to be limited in scope by the specific embodiments described herein. Indeed, various modifications of the invention in addition to those described herein will become apparent to those skilled in the art from the foregoing description and the accompanying figures. Such modifications are intended to fall within the scope of the appended claims.

- 5 [109] It is further to be understood that all values are approximate, and are provided for description.

[110] All patents and patent applications cited herein are hereby incorporated herein by reference in their entireties.

48
76

What is claimed is:

1. An influenza virus hemagglutinin (HA) molecule comprising an amino acid substitution in the receptor binding site that makes the HA molecule more antigenic with respect to antibodies specific for the HA molecule lacking the amino acid substitution in its receptor binding site.
2. The influenza virus HA molecule of claim 1 comprising the amino acid asparagine at the position corresponding to position 223 in H5 HA, wherein the inclusion of asparagine results in an increased reactivity with antisera derived from an animal exposed to an influenza virus with a wildtype HA molecule.
3. The influenza virus HA molecule of claim 1 comprising the amino acid asparagine at the position corresponding to position 223 in H5 HA, wherein the HA molecule does not originate with human H5 isolate A/HK/213/03 and the inclusion of asparagine at position 223 results in an increased reactivity with antisera derived from an animal exposed to an influenza virus.
4. The influenza virus HA molecule of claim 1, wherein the amino acid substitution alters a glycosylation site.
5. The influenza virus HA molecule of claim 1, wherein the influenza virus is a human influenza A virus.
6. The influenza virus HA molecule of claim 5, wherein the human influenza A virus is a member of the H5 subtype.
7. The influenza virus HA molecule of claim 5, wherein the human influenza A virus is A/Vietnam/1203/04 (H5N1) virus.
8. The influenza virus HA molecule of claim 1, wherein the human influenza virus is an influenza B virus.
9. The influenza virus HA molecule of claim 1 which is derived from an avian influenza virus.

- 49
77
10. A recombinant influenza virus comprising the influenza virus HA molecule of claim 1.
 11. A reverse genetics system for making a virus containing the influenza virus HA molecule of claim 1.
 12. The recombinant influenza virus of claim 10, wherein the influenza virus HA molecule is derived from H5N1 influenza virus in the genetic background of an influenza A virus.
 13. The recombinant influenza virus of claim 12, wherein the influenza A virus is a master strain virus.
 14. The recombinant influenza virus of claim 10, wherein the virus is used as a diagnostic reference virus in a hemagglutinin inhibition (HI) assay.
 15. A hemagglutinin inhibition (HI) assay kit comprising the recombinant influenza virus of claim 10.
 16. A method of making a virus containing the HA molecule of claim 1, which method comprises introducing a recombinant vector that expresses the influenza virus HA molecule of claim 1 in a reverse genetics system.
 17. A method for determining the efficacy of an influenza virus vaccine in an animal, which method comprises reacting antisera derived from a vaccinated animal with an influenza virus hemagglutinin (HA) molecule comprising one or more amino acid substitution in the receptor binding site that makes the HA molecule more antigenic with respect to antibodies specific for the HA molecule lacking the amino acid substitution in the receptor binding site which is present in the influenza virus vaccine.
 18. The method of claim 17, wherein the HA molecule originates with human H5N1 isolate A/HK/213/03 and the inclusion of asparagine at the position that corresponds to position 223 in HA from H5N1 virus results in an increased reactivity with antisera derived from the vaccinated animal.

19. A method for producing an influenza virus comprising a hemagglutinin (HA) molecule, which method comprises culturing a reverse genetics system in which DNA encoding HA encodes one or more amino acid substitution in the receptor binding site that makes the HA molecule more antigenic with respect to antibodies specific for the HA molecule lacking the amino acid substitution in the receptor binding site by a reverse genetics process.
20. A method for increasing the sensitivity of a hemagglutinin inhibition (HI) assay, which method comprises reacting antisera derived from the vaccinated or infected animal with an influenza virus hemagglutinin (HA) molecule comprising one or more amino acid substitution in the receptor binding site that makes the HA molecule more antigenic with respect to antibodies specific for the HA molecule lacking the amino acid substitution in the receptor binding site.
21. The method of claim 20, which results in at least a 2-fold increase in sensitivity of a hemagglutinin inhibition (HI) assay.
22. The method of claim 20, which results in at least a 4-fold increase in sensitivity of a hemagglutinin inhibition (HI) assay.
23. A method for determining whether an animal has been exposed to an influenza virus, which method comprises reacting antisera derived from the animal with a diagnostic reference virus, which is derived from the influenza virus in question but comprises an influenza virus hemagglutinin (HA) molecule comprising one or more amino acid substitution in the receptor binding site that makes the HA molecule more antigenic with respect to antibodies specific for the HA molecule lacking the amino acid substitution in its receptor binding site resulting in an increased reactivity with the antisera.
24. A method for determining whether an animal has been exposed to an influenza virus, which method comprises reacting antisera derived from the animal with a diagnostic reference virus, which is derived from the influenza virus in question but comprises an influenza virus HA molecule comprising the amino acid asparagine at the position corresponding to position 223 in H5 HA, wherein the inclusion of asparagine results in an increased reactivity with antisera derived from an animal exposed to an influenza virus with a wildtype HA molecule, resulting in an increased reactivity with the antisera.

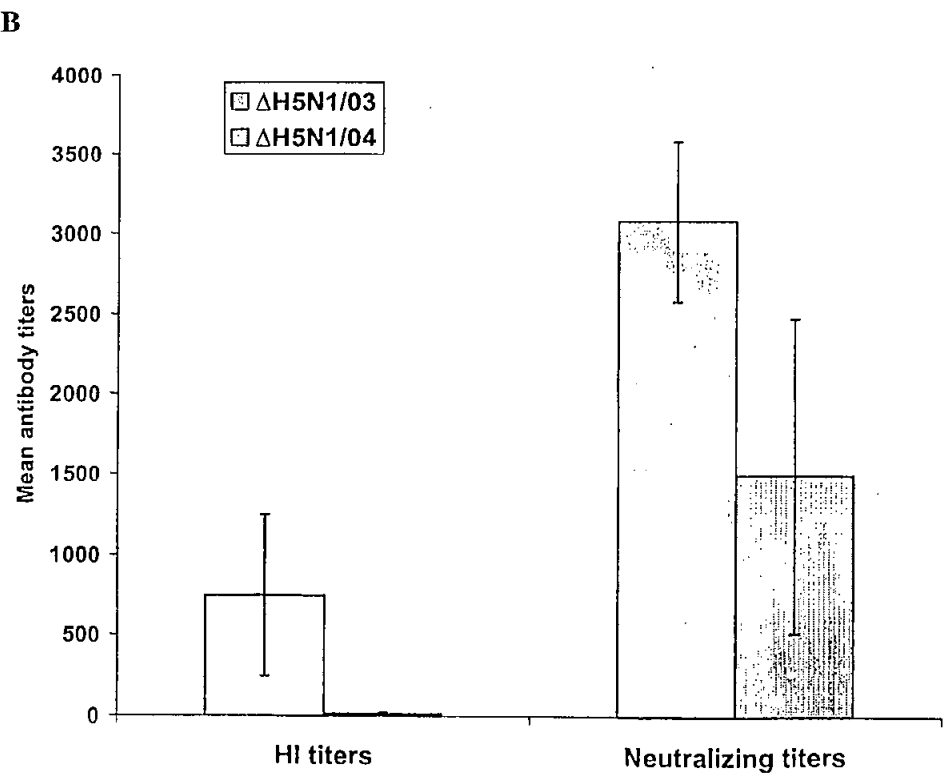
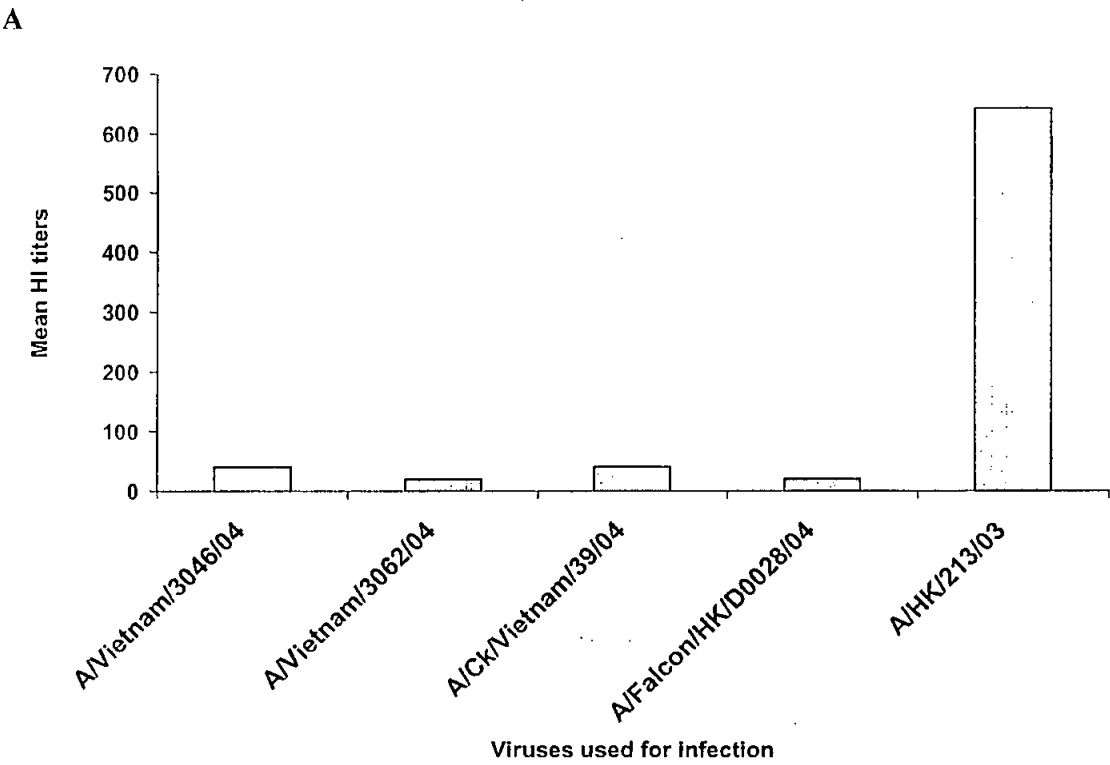
25. A method for determining whether an animal has been exposed to an influenza virus, which method comprises reacting antisera derived from the animal with a diagnostic reference virus, which is derived from the influenza virus in question but comprises the influenza virus HA molecule of claim 1 comprising the amino acid asparagine at the position corresponding to position 223 in H5 HA, wherein the HA molecule does not originate with human H5 isolate A/HK/213/03 and the inclusion of asparagine at position 223 results in an increased reactivity with antisera derived from an animal exposed to an influenza virus.
26. The method of any one of claims 17, 18, 23, 24 or 25, wherein the animal is a ferret.
27. The method of any one of claims 17, 18, 23, 24 or 25, wherein the animal is a human.
28. An influenza vaccine virus comprising a hemagglutinin (HA) molecule comprising an amino acid substitution in the receptor binding site that makes the HA molecule more antigenic with respect to antibodies specific for the HA molecule lacking the amino acid substitution in the receptor binding site and wherein the modification results in an increased immunogenicity of said vaccine virus.
29. An isolated nucleic acid encoding the influenza virus HA molecule of claim 1.
30. An isolated nucleic acid encoding the influenza virus HA molecule of claim 3.
31. A method for preparing the nucleic acid of claim 29, which method comprises introducing a nucleotide sequence into a nucleic acid encoding the HA molecule lacking the amino acid substitution in the receptor binding site, which results in an amino acid substitution in the sequence of the HA molecule that makes the HA molecule more antigenic with respect to antibodies for the HA molecule lacking the amino acid substitution.
32. The method of claim 23, wherein the HA molecule comprises an asparagine at the position that corresponds to position 223 in H5 HA.
33. The method of claim 28, wherein the influenza vaccine virus comprises an HA molecule comprising an asparagine amino acid at the position corresponding to position 223 in H5 HA.

57
80

34. An influenza virus HA molecule of any of claims 1 to 9 for use as a medicament in the treatment or prevention of an influenza virus infection.
35. Use of an influenza virus HA molecule of any of claims 1 to 9 in the manufacture of a medicament for treatment of an influenza virus infection.
36. A recombinant influenza virus comprising the influenza virus HA molecule of any of claims 1 to 9 for use as a medicament in the treatment or prevention of an influenza virus infection.
37. Use of a recombinant influenza virus comprising the influenza virus HA molecule of any of claims 1 to 9 in the manufacture of a medicament for treatment of an influenza virus infection.

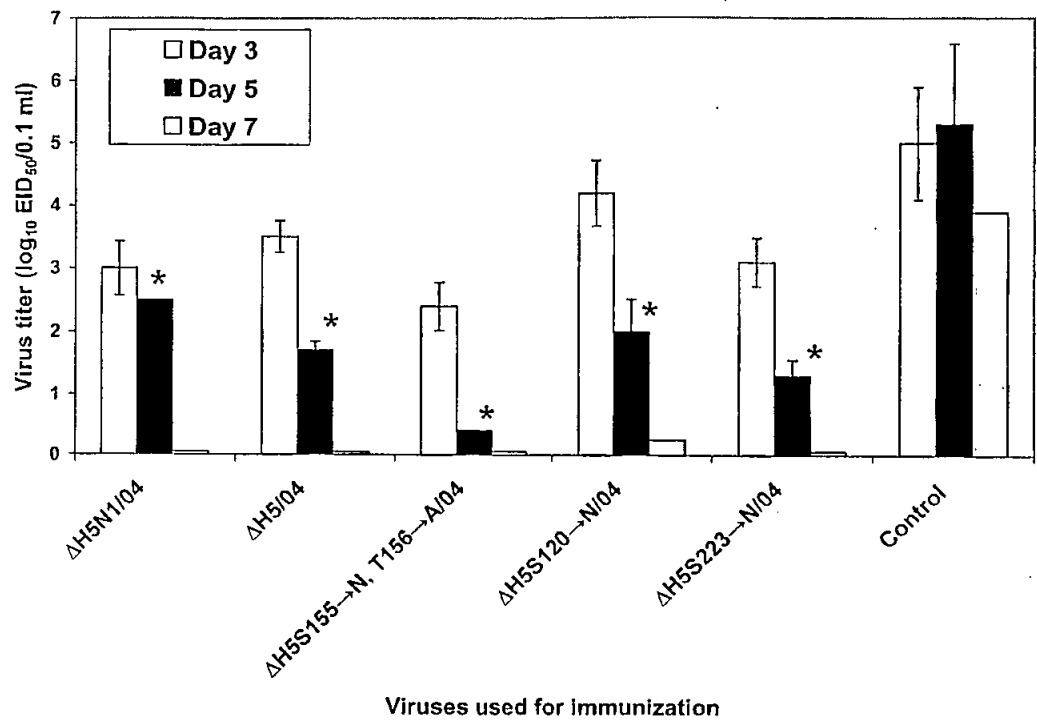
SB
81

Figure 1.



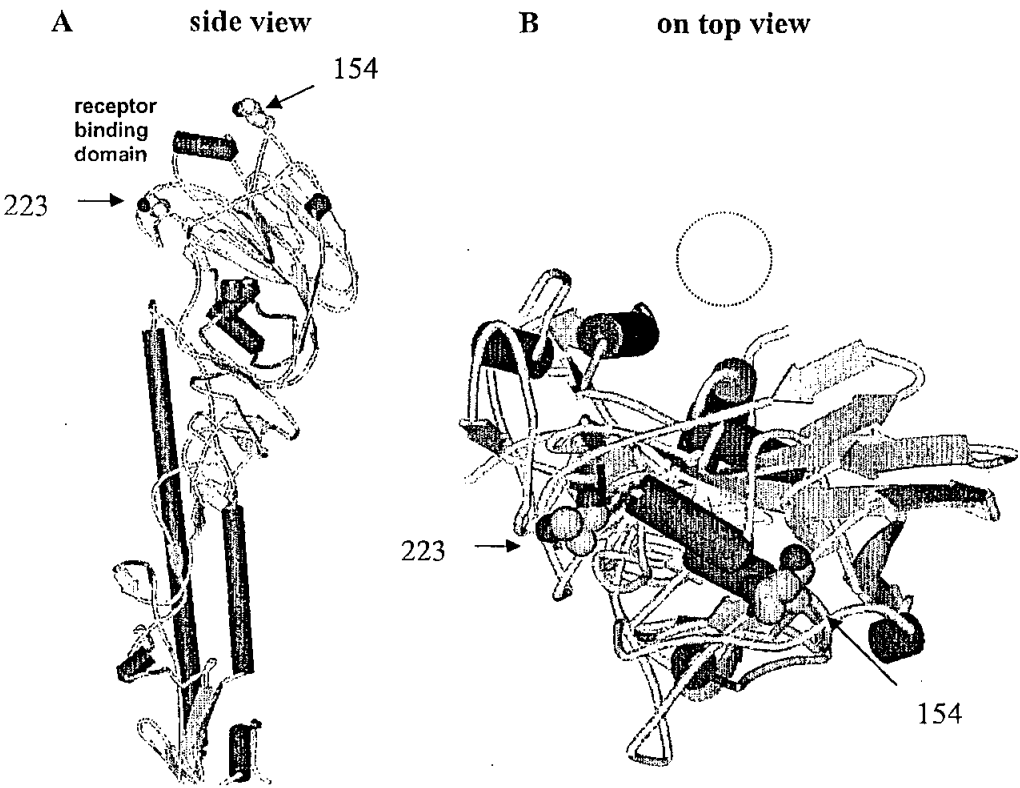
54
82

Figure 2.



SS
83

Figure 3.



86
81

Título: VIRUS DE INFLUENZA MODIFICADO PARA CONTROL Y

MEJORAMIENTO DE LA EFICIENCIA DE LA VACUNA

Sumario: La inmunogenicidad de la molécula de hemaglutinina (HA) del virus de la influenza puede aumentarse mediante
5 sustitución de aminoácidos en la secuencia de la HA. La sustitución de residuos específicos de la HA, como la asparagina en la posición 223 de la HA del H5 aumenta la sensibilidad del análisis de inhibición de la hemaglutinina (HI) al alterar la especificidad del receptor y/o la fijación
10 anticuerpo-antígeno. Las moléculas de HA que tienen tal sustitución serán útiles para el desarrollo de virus de referencia para diagnóstico y vacunas mejoradas para la influenza.

57
85

**VIRUS DE INFLUENZA MODIFICADO PARA CONTROL Y
MEJORAMIENTO DE LA EFICIENCIA DE LA VACUNA**

5 **REFERENCIA CRUZADA PARA SOLICITUDES RELACIONADAS**

[01] Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional U. S. No. 60/705,808, registrada en Agosto 4, 2005, la cual se incorpora totalmente a este como referencia.

10

**DECLARACIÓN RESPECTO A DESARROLLO O INVESTIGACIÓN CON
PATROCINIO FEDERAL**

[02] La investigación que condujo a la presente invención fue respaldada por la donación AI95357 del Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas y la donación CA21765 para el Centro de Apoyo al Cáncer (CORE) del Instituto Nacional de Salud. De acuerdo a esto, el Gobierno de los Estados Unidos tiene ciertos derechos sobre el invento.

20 **REFERENCIA A UN APÉNDICE EN DISCO COMPACTO**

[03] No aplica

CAMPO DE LA INVENCION

[04] En sentido general, el invento se refiere al incremento de la antigenicidad y/o la inmunogenicidad de un grupo de subtipos de virus de influenza.

25

ANTECEDENTES DEL INVENTO

Virus de Influenza

[05] Los virus de influenza, más notoriamente cepas particulares de los virus A y B, son una causa seria de

30

58
86

morbilidad y mortalidad en todo el mundo, con brotes anuales de la enfermedad como resultado. Periódicamente, pero a intervalos irregulares, ocurren pandemias que tienen como resultado niveles particularmente altos de enfermedad y muerte.

5 Históricamente las pandemias son la consecuencia de nuevos subtipos del virus de influenza A, creados por reordenamiento del genoma segmentado (cambio antigénico), mientras que las epidemias anuales son, generalmente, el resultado de la evolución de los antígenos de superficie de los virus de
10 influenza A y B (deriva antigénica). Los virus de la influenza humana a menudo tienen su origen en cepas de virus de influenza aviar de modo que la infección de influenza es, básicamente, una zoonosis. También hay evidencia de que el cerdo puede servir como huésped intermedio ("vasija de mezcla") para la
15 generación de nuevas cepas de origen aviar que son patógenas para los humanos (Scholtissek et al., Virología 1985, 147:287). El brote de influenza A del H5N1 en 1997 en Hong Kong, demostró que virus de influenza A altamente patógenos también pueden ser transmitidos de las especies aviares a los humanos (Claas
20 et al., Lancet 1998, 351:472; Suárez et al., J. Virol. 1998, 72:6678; Subbarao et al., Science 1998, 279:393; Shortridge, Vaccine 1999, 17(Suplem.1): S26-S29). En el 2003, los virus H5N1 en el sureste de Asia incluían diferentes genotipos en circulación conjunta, pero en el 2004 un solo genotipo,
25 conocido como el "genotipo Z", llegó a ser dominante (Li et al., Nature 2004, 430:209). La evidencia actual indica que los casos fatales en humanos fueron el resultado de transmisión directa de este genotipo de aves a humanos y que también se infectaron gatos, con transmisión directa de gato a gato
30 (Kuiken et al., Science 2004, 306:241). Esta y otra evidencia

59
87

del rango cambiante de los huéspedes y la extendida distribución de éste virus suscitaron la preocupación de que los virus H5N1 puedan adquirir las características que permitan la transmisión de humano a humano. Los humanos podrían no tener
5 inmunidad a tales nuevos virus H5N1, lo que podría ocasionar una pandemia de influenza catastrófica (Fouchier et al., Nature 2005, 435:419). El potencial de los virus de influenza A para generar nuevas cepas patogénicas a partir de un vasto número de cepas circulantes en reservorios animales indica que el control
10 de la enfermedad requiere el monitoreo de estos virus y el desarrollo de terapias antivirales y vacunas mejoradas. La velocidad de desarrollo de las nuevas cepas virales demanda vigilancia en este esfuerzo de monitoreo, lo cual incluye técnicas mejoradas para valorar la eficacia de las vacunas
15 para las nuevas cepas.

[06] Las influencias A, B y C, de la familia de las *Orthomyxoviridae*, tienen todas un genoma segmentado con ARN de filamento negativo que se replica en el núcleo de la célula
20 infectada, tiene una capacidad de codificación combinada de cerca de 13kb, y contiene la información genética de 10 proteínas virales. Específicamente, los virus de influenza tienen ocho segmentos de gen con ARN de sentido negativo (snARN) que codifican por lo menos 10 polipéptidos, entre los
25 que se incluyen las proteínas ARN polimerasa dirigidas por ARN (PB2, PB1 y PA), la nucleoproteína, la neuranimidasa (NA), la hemoglutinina (HA, que después del desdoblamiento enzimático se forma por asociación de las subunidades HA1 y HA2), las proteínas matriz (M1 y M2) y las proteínas no estructurales

(NS1 y NS2) (Krug et al., In The influenza Viruses, R.M. Krug, Ed., Plenum Press, New York, 1989, pp. 89-152).

[07] Los sistemas de genética inversa, de reciente desarrollo, han permitido la manipulación del genoma viral de la influenza (Palese et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996, 93:11354; Neumann and Kawoka, Adv. Virus Res. 1999, 53:265; Neumann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 96:9345; Fodor et al., J. Virol 1999, 73:9679). Por ejemplo, se ha demostrado que el expresión accionada por plásmidos de 8 snARN de influenza desde un promotor pol I y la coexpresión de las proteínas del complejo de polimerasa tiene como resultado la formación del virus infeccioso de influenza A (Hoffmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2000, 97:6108).

[08] La partícula viral del virus de la influenza tiene un tamaño de cerca 125 nm y consta de un núcleo de ARN viral de sentido negativo asociado con la nucleoproteína, rodeado por una cubierta viral con una estructura de bicapa lípida. La capa interna de la envoltura viral se compone predominantemente de proteínas matriz y la capa exterior contiene la mayoría del material lípido obtenido del huésped. Las denominadas "proteínas de superficie", neuraminidasa (NA) y hemoglutinina (HA), aparecen como púas en la superficie del cuerpo viral. La ineffectividad de los nuevos virus de influenza depende de la segmentación de la HA por proteasas específicas del huésped, mientras que la NA se involucra en la liberación de los viriones prole de la superficie celular y previene el amontonamiento de los virus recién formados.

[09] Las proteínas HA y NA embebidas en la envoltura viral son los determinantes antigénicos primarios del virus de la influenza (Air et al., Structure, Function and Genetics, 1989, 6:341-356; Wharton et al., In The influenza Viruses, R. M. Krug ed., Plenum Press, New York, 1989, pp. 153-174). Debido al reordenamiento del genoma segmentado de la influenza, se crean constantemente nuevas variantes de HA y de NA para las cuales un organismo infectado recientemente no tiene respuesta inmune anamnética. La glicoproteína HA es el principal antígeno para neutralizar los anticuerpos y está comprometida en la fijación de las partículas virales con los receptores en las células huésped.

[10] Las moléculas de HA de diferentes cepas muestran semejanza significativa en la secuencias a nivel tanto de ácido nucleico como de aminoácidos. Este nivel semejanza varía cuando se comparan cepas de diferentes subtipos, con algunas cepas mostrando claramente niveles más altos de similitud que otras (Air, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981, 78:7643). Los niveles de semejanza de los aminoácidos varían entre las cepas de virus de un subtipo y las cepas de virus de otros subtipos (Air, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981, 78:7643). Esta variación es suficiente para establecer subtipos discretos y el linaje evolutivo de las diferentes cepas, pero las secuencias de ADN y de aminoácidos de las diferentes cepas aún se alinean efectivamente mediante el uso de técnicas convencionales de bioinformática (Air, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981, 78:7643; Suzuki y Nei, Mol. Biol. Evol. 2002, 19:501).

67
90

VACUNAS PARA LA INFLUENZA

[11] Las vacunas para la influenza permitidas en la actualidad por las autoridades de salud pública para emplear en los Estados Unidos y Europa son vacunas de influenza inactivada, así como también, para los Estados Unidos, la vacuna viva atenuada FLUMIST. Los virus que contienen cepas de importancia epidemiológica de influenza A y de influenza B se desarrollan en huevos de gallina con embriones y las partículas virales son subsecuentemente purificadas e inactivadas por medios químicos para conformar existencias de vacunas. Cada año, la Organización Mundial de la Salud (OMS) selecciona los subtipos que tendrán más probabilidad de circular en ése año para desarrollar vacunas.

[12] Si bien las vacunas para la influenza se han usado desde principios de los años 40 para vacunación de humanos y desde finales de los años 60 para vacunación de equinos, la existencia de reservorios animales extensos combinada con la amenaza de que emerja un nuevo virus de influenza capaz de causar una pandemia ha espoleado la investigación de nuevas terapias con las cuales combatir el virus. En años recientes han ocurrido varios avances importantes en el campo de la influenza (revisados en Cox y Subbarao, Lancet 1999, 354:1277-82). Por ejemplo, una vacuna trivalente para la influenza, experimental, viva, atenuada, administrada intranasalmente mostró ser altamente efectiva para proteger niños menores contra la influenza A H3N2 y la influenza B. Otras aproximaciones al mejoramiento de la eficacia de las vacunas corrientes de virus de influenza (inactivados) incluyen la generación de virus de influenza adaptados al frío y virus

63
91

obtenidos por ingeniería genética que contienen mutaciones atenuantes específicas (revisado en Palese et al., J. Infect. Dis., 1997, 176 Suppl 1:S45-9). Se espera que esos virus alterados genéticamente, en los que los genes HA y NA de las
5 cepas circulantes han sido incorporados por reordenación, puedan usarse como vacunas seguras de virus de influenza vivos, para inducir una respuesta protectora de inmunidad de larga duración en humanos. Aunque las vacunas adaptadas al frío parecen ser eficaces en niños y adultos jóvenes, pueden ser muy
10 atenuadas para estimular una respuesta de inmunidad ideal en gente mayor, el mayor grupo entre los 20000-40000 individuos que mueren cada año en los Estados Unidos como consecuencia de infección por influenza.

15 [13] Las vacunas prontamente disponibles proveerían la herramienta más efectiva contra la influenza pandémica emergente. Después del brote de H5N1 de 1997 en Hog Kong, se ensayaron en humanos vacunas producidas según dos planteamientos diferentes. La vacuna convencional de la
20 subunidad H5 producida del A/duck/Singapore/3/97 fue pobremente inmunogénica en humanos, aun contra cepas de estrecha relación antigénica y después de vacunación múltiple (Nicholson et al., Lancet 2001, 357:1937; Stephenson et al., Journal of Infectious Disease 2005, 191:1210). El empleo del coadjuvante MF59 aumentó
25 el título de anticuerpos de ésta vacuna H5 (Stephenson y otros, Vaccine 2003, 21:1687). La vacunación con vacuna "fraccionada" inactivada derivada del virus no patógeno A/duck/HK/836/80 (H3N1) y de la hemoglutininina H5 modificada por el virus A/HK/156/97 (H5N1) indujo títulos escasamente detectables de
30 anticuerpos neutralizantes (Takada et al., Journal of Virology

64
92

1999, 73:8303). Así, aunque estas vacunas H5N1 fueron bien toleradas, resultaron ser poco inmunogénicas. La carencia actual de vacunas efectivas contra las cepas del virus H5N1 aumenta la amenaza de que estos virus ocasionen enfermedad
5 pandémica.

INMUNOGENICIDAD DE LA VACUNA PARA INFLUENZA

[14] Los métodos para titular los anticuerpos en el suero son las mediciones sustituto aceptadas de la protección de inmunidad después de la vacunación o infección viral. Los
10 métodos de titulación de anticuerpos en el suero empleados predominantemente son los ensayos para el título de neutralización del virus y los ensayos para el título de inhibición de la hemaglutinina (HI). Estos ensayos están basados en la habilidad de los anticuerpos de la influenza en
15 el suero humano para hacer reacciones cruzadas con los antígenos bajo condiciones *in vitro*. Los ensayos para una situación dada se seleccionan no solamente con base en la habilidad para suministrar resultados consistentes y aplicables sino también con base en la facilidad de empleo y los
20 requisitos de instalaciones para cada tipo de ensayo.

[15] Expresado brevemente, el ensayo de neutralización del virus examina la habilidad de los anticuerpos de una muestra de suero para bloquear la infección por virus de influenza en
25 células cultivadas. El ensayo se lleva a cabo haciendo diluciones en serie (títulos) de una muestra de suero y combinando cada una de esas diluciones con una cantidad estándar de virus infeccioso. Cada mezcla de dilución se lleva a un cultivo de células definido y se determinan las tasas de
30 infección resultantes. El ensayo de título de neutralización

del virus es considerado como una prueba extremadamente útil y confiable para examinar el nivel de anticuerpos inmunoprotectores presentes en un individuo dado. Sin embargo, depende de servicios especializados en cultivo de células y por lo tanto no está disponible universalmente. La metodología también es laboriosa y requiere consumo de tiempo por lo cual es poco apropiada para el análisis sistemático de gran número de muestras.

10 [16] Análogamente, el ensayo de inhibición de la hemaglutinina (HI) examina la habilidad de los anticuerpos de una muestra de suero para fijarse con un virus de referencia estandarizado. La base para éste ensayo es el hecho de que los virus de la influenza se fijarán a y aglutinarán a los eritrocitos. En el
15 ensayo para HI, diluciones en serie de una muestra de suero se mezclan con cantidades estandarizadas de virus de referencia y se adicionan a los eritrocitos después de un período determinado de incubación. La asociación de virus de referencia y eritrocitos en complejos se detecta entonces visualmente. La
20 dilución máxima del suero que inhibe la hemaglutinina se lee como título de inhibición de la hemaglutinina. Aunque no es tan sensible en cuanto a la inmunogenicidad de la vacuna como otros ensayos, el ensayo para HI se usa ampliamente debido a su tecnología relativamente simple y a los requisitos de
25 laboratorio.

[17] Dadas las limitaciones antes discutidas sobre las técnicas disponibles actualmente para desarrollo y evaluación de vacunas de influenza, hay la necesidad de mejorar las técnicas para
30 evaluación de la inmunogenicidad para probar la respuesta de

66
94

inmunidad después de la infección, así como también la eficacia de la vacuna.

SUMARIO DE LA INVENCION

[18] El presente invento estipula sustituciones de aminoácidos en la molécula de hemoglutinina (HA) de la influenza A que pueden alterar la antigenicidad y la inmunogenicidad del HA. Esas sustituciones pueden alterar sitios antigénicos mediante alteración de la especificidad del receptor y/o la unión anticuerpo-antígeno. En una variedad de incorporaciones, la antigenicidad aumentada, resultante de la sustitución, puede ser útil para incrementar la sensibilidad del ensayo de la hemoglutinina (HI) en suero obtenido de animales infectados. Esta información es importante para la producción de virus de referencia para diagnóstico y nuevas vacunas para influenza. De preferencia, la sustitución de aminoácidos tiene como resultado moléculas con las características de inmunogenicidad de la sustitución del aminoácido asparagina en la ubicación 223 de la HA del H5.

[19] Así, dentro de ciertos aspectos, el presente invento incluye una molécula de hemoglutinina A del virus de la influenza que contiene una o más sustituciones de aminoácidos en el sitio de fijación del receptor lo cual hace la molécula HA más antigénica con respecto a los anticuerpos específicos que la molécula de HA carente de sustitución de aminoácidos en su sitio de fijación del receptor. La molécula HA, del virus de influenza, que tiene antigenicidad aumentada puede contener el aminoácido asparagina en el lugar correspondiente a la posición 223 en la HA del H5, en donde la inclusión de la asparagina produce una reactividad aumentada con los antisueros obtenidos

98

de un animal expuesto a un virus de influenza con una molécula HA de tipo silvestre. La molécula HA, del virus de influenza, que tiene antigenicidad aumentada puede contener el aminoácido asparagina en el lugar correspondiente la posición 223 en la HA del H5, en donde la molécula HA no tiene origen en el H5 del aislado humano del A/HK/213/03 y la inclusión de la asparagina en la posición 223 resulta en una reactividad aumentada con los antisueros obtenidos de un animal expuesto a un virus de influenza. En algunas incorporaciones, la sustitución de aminoácidos altera un sitio de glicosilación. En algunas incorporaciones, el virus de influenza es un virus de influenza A humano. Por ejemplo, el virus humano de influenza A puede ser un miembro del subtipo H5. El virus humano de influenza A puede ser un virus A/Vietnam/1203/04/ (H5N1). En algunas incorporaciones, el virus de la influenza es un virus de influenza B. El invento contiene moléculas HA del virus de influenza, con antigenicidad incrementada, que se derivan de virus de influenza aviar.

[20] Entre otros aspectos, el invento incluye un virus de influenza recombinante que contiene una molécula de hemoglutinina (HA) del virus de influenza con una o más sustituciones de aminoácidos en el sitio de fijación del receptor que hace a la molécula HA más antigénica con respecto a los anticuerpos específicos que la molécula HA carente de sustitución de aminoácidos en el sitio de fijación del receptor. El virus recombinante puede contener una molécula HA modificada derivada del virus de influenza H5N1 en el antecedente genético de un virus de influenza A. El virus de influenza A puede ser un virus de cepa maestra. El virus

68
96

recombinante puede ser empleado como un virus de referencia para diagnóstico en un ensayo de inhibición de hemaglutinina (HI). El virus recombinante de influenza puede ser incluido en un conjunto para ensayo de inhibición de la hemaglutinina (HI).

5

[21] Aspectos aún más novedosos de la invención incluyen sistemas de genética inversa para hacer un virus que contenga una molécula de hemaglutinina (HA) de virus de influenza con una sustitución de aminoácidos en el sitio de fijación del receptor que haga a la molécula HA más antigénica con respecto a los anticuerpos específicos que la molécula HA carente de sustitución de aminoácidos en el sitio de fijación del receptor.

15 [22] Más aún, otros aspectos de la invención revelados acá incluyen métodos para producir un virus que contenga una molécula de hemaglutinina (HA) de virus de influenza que incluya una o más sustituciones de aminoácidos en el sitio de fijación del receptor que hacen a la molécula HA más antigénica con respecto a los anticuerpos específicos que la molécula HA carente de sustitución de aminoácidos en el sitio de fijación del receptor. En algunas incorporaciones, el método comprende la introducción de un vector recombinante que exprese la molécula de antigenicidad aumentada en un sistema de genética
20 inversa.

[23] En aspectos relacionados, el invento provee además métodos para determinar la eficiencia de una vacuna de virus de influenza en un animal. En algunas incorporaciones, el método
30 incluye hacer reaccionar antisueros obtenidos de un animal

69
97

vacunado con una vacuna con una molécula de hemaglutinina (HA) de virus de influenza con una sustitución de uno o más aminoácidos en el sitio de fijación del receptor que hace a la molécula HA más antigénica con respecto a los anticuerpos
5 específicos que la molécula HA carente de sustitución de aminoácidos en el sitio de fijación del receptor que está presente en la vacuna del virus de influenza. En algunas incorporaciones, la molécula HA de antigenicidad aumentada se origina en H5 del aislado humano del A/HK/213/03 y la inclusión
10 de asparagina en la posición que corresponde a la posición 223 en el HA del virus H5N1 tiene como resultado una reactividad aumentada con antisueros obtenidos del animal infectado. En algunas incorporaciones, el animal es un humano. En otras incorporaciones el animal es un hurón.

15

[24] Además, otros aspectos relacionados con el presente invento proveen métodos para producir un virus de influenza que contenga una molécula de hemaglutinina (HA), método que comprende el cultivo de un sistema de genética inversa en el
20 cual el ADN que codifica el HA codifica una o más sustituciones de aminoácidos en el sitio de fijación del receptor que hace a la molécula HA más antigénica con respecto a los anticuerpos específicos que la molécula HA carente de sustitución de aminoácidos en el sitio de fijación del receptor por un proceso
25 de genética inversa.

[25] El invento, además provee métodos para incrementar la sensibilidad del ensayo de inhibición de la hemaglutinina (HI), métodos que incluyen antisueros obtenidos de animales
30 infectados o vacunados que reaccionan con una molécula de

90
98

hemoglutinina (HA) de virus de influenza con una o más sustituciones de aminoácidos en el sitio de fijación del receptor que hace a la molécula HA más antigénica con respecto a los anticuerpos específicos que la molécula HA carente de sustitución de aminoácidos en el sitio de fijación del receptor. En algunas incorporaciones, el método para incrementar la sensibilidad de un ensayo para HI resulta por lo menos en un incremento duplicado de la sensibilidad para un ensayo de inhibición de la hemoglutinina (HI). En algunas incorporaciones, el método para incrementar la sensibilidad de un ensayo para HI resulta por lo menos en un incremento cuadruplicado en la sensibilidad para un ensayo de inhibición de la hemoglutinina (HI).

[26] Otro aspecto del invento incluye métodos para determinar cuándo un animal ha sido expuesto a un virus de influenza. En algunas incorporaciones, el método incluye antisueros obtenidos del animal que reaccionan con un virus de referencia para diagnóstico, que es obtenido del virus de influenza en cuestión pero que contiene una molécula de hemoglutinina (HA) de virus de influenza con una sustitución de aminoácidos en el sitio de fijación del receptor que hace a la molécula HA más antigénica con respecto a los anticuerpos específicos que la molécula HA carente de sustitución de aminoácidos en el sitio de fijación del receptor con el resultado de una reactividad incrementada con los antisueros. En algunas incorporaciones, el animal es un humano. En otras incorporaciones el animal es un hurón.

7/9

[27] El invento incluye, entre otros aspectos más, métodos para determinar cuándo un animal ha sido expuesto a un virus de influenza. En algunas incorporaciones, el método incluye antisueros, obtenidos del animal, que reaccionan con un virus de referencia para diagnóstico, que es obtenido del virus de influenza en cuestión pero que contiene una molécula HA modificada del virus de influenza que contiene el aminoácido asparagina en la posición correspondiente a la posición 223 en la HA del H5, en donde la inclusión de la asparagina tiene como resultado una reactividad incrementada con los antisueros obtenidos de un animal expuesto a un virus de influenza con una molécula HA de tipo silvestre, con el resultado de una reactividad incrementada con los antisueros. En algunas incorporaciones, el método para determinar cuándo un animal ha sido expuesto a un virus de influenza incluye hacer reaccionar antisueros, obtenidos del animal, con un virus de referencia para diagnóstico, que es obtenido del virus de influenza en cuestión pero que contiene una molécula HA modificada del virus de influenza que contiene el aminoácido asparagina en la posición correspondiente a la posición 223 en la HA del H5, en donde la molécula HA no se origina con el H5 del aislado humano del A/HK/213/03 y la inclusión de la asparagina en la posición 223 tiene como resultado una reactividad incrementada con los antisueros obtenidos de un animal expuesto a un virus de influenza. En algunas incorporaciones, el animal es un humano. En otras incorporaciones el animal es un hurón.

[28] También están incluidos en el invento virus de vacuna de influenza que contienen una molécula de hemoglutinina (HA) con una sustitución de aminoácidos en el sitio de fijación del

72
100

receptor que hace a la molécula HA más antigénica, con respecto a los anticuerpos específicos, que la molécula HA carente de sustitución de aminoácidos en el sitio de fijación del receptor y en donde la modificación tiene como resultado una
5 inmunogenicidad aumentada del dicho virus de la vacuna.

[29] Un aspecto de ésta invención incluye ácidos nucleicos aislados que codifican una molécula de hemaglutinina (HA) de virus de influenza con una sustitución de aminoácidos en el
10 sitio de fijación del receptor que hace a la molécula HA más antigénica con respecto a los anticuerpos específicos que la molécula HA carente de sustitución de aminoácidos en el sitio de fijación del receptor. En algunas incorporaciones, la molécula Ha del virus de influenza codificada por el ácido
15 nucleico aislado contiene una aminoácido, asparagina, en la posición correspondiente a la posición 223 en la HA del H5, en donde la molécula HA no se origina con el H5 del aislado humano del A/HK/213/03 y la inclusión de la asparagina en la posición 223 tiene como resultado una reactividad aumentada con los
20 antisueros obtenidos de un animal expuesto a un virus de influenza.

[30] El invento incluye, adicionalmente, métodos para preparar ácidos nucleicos que codifican una molécula de hemaglutinina
25 (HA) de virus de influenza con una sustitución de aminoácidos en el sitio de fijación del receptor que hace a la molécula HA más antigénica con respecto a los anticuerpos específicos que la molécula HA carente de sustitución de aminoácidos en el sitio de fijación del receptor. En algunas incorporaciones, el
30 método comprende la introducción de un secuencia de nucleótidos

73
101

en un ácido nucleico que codifica la molécula HA que carece de sustitución de aminoácidos en el punto de fijación del receptor, lo cual tiene como resultado una sustitución de aminoácidos en la secuencia de la molécula HA que hace que la molécula HA sea más antigénica con respecto a los anticuerpos que la molécula HA que carece de sustitución de aminoácidos.

[31] El presente invento satisface estos y otros aspectos del invento, según se establece con mayor detalle en la Descripción Detallada y los Ejemplos.

10

DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

[32] La Fig. 1 es una gráfica que indica títulos de anticuerpos HI en hurones inoculados con virus de influenza H5N1, aislados en 20003 y 2004 (A); títulos de neutralización y de HI de virus en hurones inmunizados con virus ΔH5N1/03 y ΔH5N1/04 (B).

15

En la figura 1A los sueros fueron recolectados en el día 28 después de la inoculación con 10^6 EID₅₀ de virus H5N1 y titulados contra 4 unidades hemaglutinantes (HAU) de virus homólogos. Los datos son valores representativos de dos o cuatro sueros. En la figura 1B, los sueros se recolectaron de hurones vacunados x 2 con 7μg de HA de los virus ΔH5N1/03 y ΔH5N1/04 y titulados contra 4 HAU y 100 T_{ICD}₅₀ de virus homólogos, respectivamente.

20

[33] La figura 2 es una gráfica que indica los títulos de virus en lavados nasales de hurones vacunados y de control después de estimular con virus A/Vietnam/1203/04 (H5N1). A los hurones vacunados con virus recombinantes ΔH5N1/04 o ΔH5/04 se les inculó intranasalmente con 10^6 EID₅₀ de virus A/Vietnam/1203/04. Los títulos son los valores promedio ($\log_{10}$ EID₅₀/0.1ml)±SD de las determinaciones en los lavados nasales de tres (3) hurones.

25

[34] Notar que las diferencias en los títulos entre los grupos vacunados y de control son significantes en los valores P 0.0028-0.0173G de acuerdo con resultados de ensayos t no pareados.

5

[35] La figura 3 es un modelo molecular del polipéptido de la HA del H5 que muestra la ubicación del aminoácido en las posiciones 154 y 223 en la estructura tridimensional (3D) del HA del virus A/duck/Singapore/3/97 (H5N3). En la figura 3A, se indica el punto de fijación del receptor de los aminoácidos en la estructura tridimensional. En la figura 3B, el círculo representa la interfase entre el monómero mostrado y otros dos monómeros, no mostrados, en el HA trimérico. El aminoácido en la posición 223 está situado en la espira 220 del dominio de fijación del receptor, entre la glutamina, generalmente presente en la posición 222 y la glicina, generalmente presente en la posición 224.

DESCRIPCION DETALLADA

[36] El presente invento estipula cambios en la secuencia de aminoácidos en la molécula de hemaglutinina (HA) del virus de influenza, que hacen a la molécula HA más antigénica con respecto a anticuerpos específicos que las moléculas de HA que carecen de los cambios. Tales cambios de secuencia incluyen sustituciones y supresiones. El HA resultante se designa como un "HA de antigenicidad aumentada".

[37] La antigenicidad aumentada de la molécula HA es útil para probar la eficacia de la vacuna, puesto que el cambio aumenta la sensibilidad de las pruebas de diagnóstico para anticuerpos contra el virus de influenza en el suero. En una incorporación

específica el virus es un virus de influenza A. En una
incorporación alterna, el virus puede ser también un virus de
influenza B, y aún en otra incorporación puede ser un virus de
influenza C. En una incorporación en que la influenza es un
5 virus de influenza A, puede ser un virus de influenza A del
subtipo H5. En una incorporación más específica, la molécula HA
del subtipo H5 se modifica para incluir el aminoácido
asparagina en la posición 223 (N₂₂₃), con el resultado de una
reactividad aumentada a los sueros obtenidos de animales
10 expuestos a un virus de influenza del subtipo H5. En una
incorporación específica, la molécula HA de la invención no es
una molécula HA del A/HK/213/03, que es un subtipo H5 de
ocurrencia natural con asparagina en la posición 223. El virus
de influenza puede ser un virus de influenza A humano del
15 subtipo H5, incluyendo el virus A/Vietnam/1203/04.

[38] Un cambio de aminoácido que hace la molécula HA más
antigénica puede hacerse en el dominio de fijación del receptor
del HA, e. g., según se representa en la Figura 3A,
20 particularmente en la espira 220 del dominio de fijación del
receptor. Tal cambio puede reducir la fijación del HA a los
receptores del ácido siálico en los glóbulos rojos,
incrementando así la habilidad de los anticuerpos anti-HA para
inhibir la hemaglutinación, con el resultado de una ampliación
25 del efecto de la actividad de fijación de anticuerpos en un
ensayo de inhibición de la hemaglutinación. Alternativamente,
un cambio de aminoácidos que hace la molécula de HA más
antigénica puede efectuarse para cambiar o quitar un punto de
glicosilación en la proteína HA, en particular un sitio de
30 glicosilación que enmascara epítomos en el HA reconocido por

anticuerpos específicos HA. En otra incorporación más, el cambio de aminoácidos puede hacerse a un residuo de aminoácidos que corresponda al residuo 223 del subtipo H5 del HA. En todas las incorporaciones de la invención, las modificaciones de aminoácidos, que hacen una molécula HA más antigénica, pueden identificarse sin dificultad mediante pruebas inmunológicas en las que se usan anticuerpos específicos para el subtipo particular de HA. Una modificación que hace más antigénica la molécula HA tendrá como resultado un título de actividad de fijación del anticuerpo aparentemente más alto en relación con la actividad de fijación de la molécula HA a la cual se le sacaron los anticuerpos. Tales ensayos incluyen los ensayos de inhibición de la hemaglutinina (HI).

[39] En una incorporación efectiva, sustituir en una molécula HA del subtipo H5 de un residuo de serina (que puede ser un residuo glicosilado) por asparagina (que puede ser no glicosilada o con glicosilación diferente) tiene como resultado un aumento de antigenicidad. Sin embargo, otras sustituciones pueden también tener como resultado un aumento aparente de antigenicidad. Tales sustituciones pueden ser, pero no necesitan serlo, preservativas, como la de treonina por serina o glutamina por asparagina. Pueden preservar la polaridad relativa, como la asparagina por serina, o la lisina por ácido aspártico, que conserva la polaridad sin mantener el cambio mismo. También se ha contemplado sustituir con residuos tales como glicina y alanina que elimina una cadena lateral reactiva sin tener un gran efecto en la estructura del polipéptido. Finalmente, son posibles también los cambios no conservadores por completo. De nuevo, las pruebas inmunológicas indicarán

77
105

cuándo un cambio en particular tiene como resultado un aumento de antigenicidad.

[40] Algunos virus aviares H5N1 aislados en América Central y en Suramérica tienen un aminoácido básico, arginina, en la posición 223. El aminoácido neutro asparagina en la posición 223 se encuentra en el HA del aislado humano del A/HK/213/03. Este residuo de aminoácido se sitúa en la espira 220 del dominio de fijación del receptor, entre la glutamina, generalmente presente en la posición 222 y la glicina, generalmente presente en la posición 224 (Fig.3). La evidencia experimental sugiere que los títulos más altos de HI reflejan un cambio en la especificidad del receptor. En efecto, la glutamina, generalmente presente en la posición 222 y la glicina, generalmente presente en la posición 224 se fijan directamente al receptor ácido siálico. Los aminoácidos de la espira 220 o adyacentes a ella son importantes para la conformación de la cavidad de fijación del receptor (Ha y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2001, 98:11181). Aunque la presente invención no se atiene a ninguna explicación particular del efecto observado, es posible que la sustitución de asparagina por serina en la posición 223 del H5 tenga como resultado cambios de conformación y alteración en la especificidad del receptor.

25

[41] En un aspecto adicional, las moléculas HA modificadas de acuerdo con el invento para ser más antigénicas también son más inmunogénicas. Tales moléculas pueden producir una respuesta inmune más fuerte o más potente como componentes de una vacuna

78
106

para la influenza, lo cual a su turno tiene como resultado una mayor protección contra la infección por influenza.

[42] Los virus de influenza originados en reservorios aviares son de particular interés para la salud pública. Se cree que éstos virus son particularmente aptos para causar brotes pandémicos de influenza en humanos. Una molécula HA de un subtipo aviar con antigenicidad y/o inmunogenicidad aumentada sería entonces particularmente útil para las pruebas inmunológicas adelantadas juntamente con el desarrollo de la vacuna. La estrategia que aquí dentro se ejemplifica con respecto al H5 es útil para aumentar los títulos de ensayo de la HI (inhibición de la aglutinina) contra otros subtipos de HA, y esto es particularmente útil para evaluar la inmunidad a la influenza aviar. En algunas incorporaciones, la molécula de Ha con la sustitución de aminoácidos en el sitio de fijación del receptor puede ser obtenida de un virus de influenza aviar, incluyendo los subtipos H1 a H6 inclusive.

[43] Un aspecto de esta invención incluye el empleo de virus recombinante de influenza que tiene una molécula HA de antigenicidad aumentada como virus de referencia en un ensayo inmunológico, en particular un ensayo para HI, incluyendo un conjunto para efectuar tal ensayo. Por ejemplo, la sustitución de la asparagina en la posición 223 de la molécula HA del H5 aumenta la fijación a los receptores de ácido siálico de los glóbulos rojos con enlaces alfa (α) 2,6, como los de los pollos, pero disminuye la fijación a los receptores con un enlace alfa (α) 2,3 en el ácido siálico N-glicosilado, como los de los caballos. Así, un aspecto del invento sugiere que las

fijaciones más bajas en las células rojas de la sangre de los caballos (RBCs) requerirían cantidades menores de anticuerpos para inhibir la hemaglutinación. Este concepto, de introducir sustitución de aminoácidos que aumentan la antigenicidad, según se mide por la fijación de los anticuerpos, puede ser aplicado a todos los 16 subtipos de HA, incluyendo aquellos de los virus de influenza A aviar.

[44] El invento incluye métodos para determinar la eficacia de una vacuna de virus de influenza en un animal. Este método implica antisueros obtenidos del animal vacunado que reaccionan con un virus de influenza que tiene una molécula de hemoglutinina (HA) con antigenicidad aumentada. Algunos aspectos de los métodos para determinar la eficacia de una vacuna de virus de influenza en un animal, como se demostró en los ejemplos, incluye la reacción de los antisueros obtenidos del animal vacunado con una molécula HA de virus de influenza del subtipo H5 que contiene el aminoácido asparagina en la posición 223 (N₂₂₃), p.ej., la molécula HA del aislado H5N1 humano del A/HK/213/03. La asparagina en la posición 223 tiene como resultado un aumento en la reactividad con los antisueros obtenidos de un animal expuesto a diferentes virus de influenza H5. El animal vacunado puede ser cualquiera de un número de especies, incluyendo hurones y humanos.

[45] Dentro de este invento también se han incluido métodos para aumentar la sensibilidad de un ensayo HI mediante el empleo de un virus de referencia que contiene una molécula HA de antigenicidad aumentada. En algunas incorporaciones, tales como cuando la molécula HA se origina con H5N1 de un aislado humano de la cepa A/HK/213/03, el cambio de aminoácidos es la

80
(08)

presencia de asparagina en la posición 223, con el resultado de una reactividad aumentada con los antisueros obtenidos de un animal expuesto a un virus de influenza H5 con un residuo diferente de aminoácido es esa posición, tal como el
5 A/Vietnam/1203/04. Esta reactividad aumentada puede ser de cualquier nivel que incluya un aumento de por lo menos 2 a 4 veces en reactividad. Un aumento de 2 a 4 veces en la reactividad puede tener una importancia especial en situaciones en las que los puntos finales de las titulaciones
10 convencionales están por debajo del límite de detección.

[46] En una incorporación específica, el invento incluye también el empleo, como virus de referencia para diagnóstico, de un virus recombinante de influenza que contiene una molécula
15 HA modificada del subtipo H5 con el aminoácido asparagina en la posición 223, con el resultado de una reactividad aumentada con los antisueros obtenidos de un animal expuesto a un virus de influenza H5. En una incorporación específica, la molécula HA del H5 del virus de referencia para diagnóstico se origina con
20 H5N1 del aislado humano de la cepa A/HK/213/03. En otra incorporación se sustituye una asparagina (o glutamato) en la posición 223 de una molécula H5 de otra cepa de influenza. Es fácilmente aparente que la misma aproximación puede ser adaptada a cualquier molécula HA de cualquier cepa de
25 influenza. En varias incorporaciones, el animal puede ser de un número de especies, incluyendo hurones y humanos.

[47] En adición al empleo de virus de referencia con sensibilidad aumentada en pruebas clínicas de vacunas humanas,
30 estos virus pueden ser empleados en estudios de

seroepidemiología. La disponibilidad de datos que muestran cuantos humanos fueron infectados con virus H5N1, usando métodos de detección rápidos y simples como los ensayos para HI, suministra información importante sobre la ocurrencia frecuente de los virus H5N1 en los humanos. Esta información puede usarse para evaluar la probabilidad de la propagación de los virus H5N1 de humano a humano o entre especies aviares y humanos.

10 [48] Otros aspectos del invento incluyen métodos para determinar cuando un animal ha sido expuesto a un virus de influenza por antisueros obtenidos del animal que reaccionan con un virus de referencia para diagnóstico. El virus de referencia para diagnóstico se obtiene de la misma cepa de virus de influenza como virus de exposición, pero el virus de referencia contiene una molécula Ha de antigenicidad aumentada. En una incorporación, el virus de referencia contiene una molécula de HA con una asparagina en la posición correspondiente a la posición 223 en la HA del H5, en donde la inclusión de la asparagina tiene como resultado una reactividad aumentada con los antisueros obtenidos de un animal expuesto a un virus de influenza con una molécula HA de tipo silvestre, con una reactividad aumentada con los antisueros como consecuencia. En otra incorporación, el virus de referencia contiene una molécula de hemoglutinina (HA) del virus de influenza que tiene un aminoácido asparagina en la posición correspondiente a la posición 223 en la HA del H5, y la molécula HA no se origina con H5 del aislado humano del A/HK/213/03 y la inclusión de la asparagina en la posición 223 resulta en una reactividad aumentada con los antisueros

87
110

obtenidos de un animal expuesto al virus de influenza. En una incorporación específica, el virus contraído es un virus H5N1 y el virus de referencia es el H5N1m del aislado humano del A/HK/213/03, que contiene asparagina en la posición de aminoácido 223, con el resultado de una reactividad aumentada con los antisueros específicos H5N1. En diferentes aspectos del invento, el animal puede ser de cualquier especie, incluyendo hurones y humanos.

10 [49] El invento también abarca vacunas de influenza que incluyen una molécula HA de antigenicidad aumentada. En una incorporación específica, el virus es el H5N1 de un aislado humano. En una incorporación más específica, el HA es obtenido del A/HK/213/03. Aún en otra incorporación, el HA es un H5
15 modificado para incluir el aminoácido asparagina en la posición 223.

[50] La introducción de modificaciones en la molécula HA requiere manipulación a nivel genético, como es bien sabido en el arte, según se explica adelante con mucho detalle. Una vez
20 que el gen modificado HA se ha preparado, se dispone de un número de opciones, tales como las opciones de "genética inversa" para introducir la molécula modificada de HA dentro de un virus de influenza, el cual podrá convertirse entonces en un
25 virus de referencia para probar la eficacia de la vacuna, o en un virus de referencia para diagnóstico, para hacer seguimiento a los epidémicos de la influenza, incluyendo propagación del virus animal-humano y propagación del virus humano-humano.

83
111

[51] En algunos aspectos, el invento incluye virus de influenza recombinantes que contienen una molécula de hemoglutinina (HA) de virus de influenza con al menos un cambio de secuencia de aminoácido que hace a la molécula de HA más antigénica con respecto a los anticuerpos específicos que las moléculas de HA que carecen de los cambios. El cambio de secuencia de aminoácido puede incluir la sustitución o la pérdida de uno o más aminoácidos. La molécula HA modificada puede obtenerse del virus de influenza H5N1 en el antecedente genético de un virus de influenza. En algunas incorporaciones, el virus de influenza A es un virus de cepa maestra. Los virus recombinantes que contienen una molécula modificada de (HA) que es más antigénica con respecto a los anticuerpos específicos que las moléculas de HA que carecen del cambio en la secuencia de aminoácidos pueden ser empleados como virus de referencia para diagnóstico en un ensayo de inhibición de la hemoglutinina (HI). El virus recombinante también puede estar incluido en un conjunto para el ensayo de la inhibición de la hemoglutinina (HI).

[52] En otros aspectos, el invento incluye métodos para hacer un virus que contiene una molécula de hemoglutinina (HA). Por ejemplo, un aspecto de la invención incluye el método para hacer un virus que contiene una molécula de hemoglutinina (HA) con al menos un cambio en la secuencia de aminoácidos que hace a la molécula HA más antigénica con respecto a los anticuerpos específicos que las moléculas de HA que carecen de los cambios. El método puede incluir la introducción de un vector recombinante que exprese la HA modificada en un sistema de genética inversa. Un método para producir un virus de influenza con una molécula de hemoglutinina puede incluir el cultivo de

un sistema de genética inversa en el que el ADN que codifica el HA codifica una sustitución de aminoácido en el sitio de fijación del receptor que hace a la molécula de HA más antigénica respecto a los anticuerpos específicos que las 5 moléculas de HA que carecen de la sustitución de aminoácido en el sitio de fijación del receptor por medio de un proceso de genética inversa.

[53] También están incluidos en el invento métodos para 10 preparar ácidos nucleicos que codifican una molécula de hemoglutinina (HA). La molécula HA puede tener por lo menos un cambio de secuencia de aminoácido que hace a la molécula HA más antigénica respecto a los anticuerpos específicos que las moléculas de HA que carecen de los cambios. En algunas 15 incorporaciones, el método comprende la introducción de una secuencia de nucleótidos en un ácido nucleico que codifica la molécula de HA que carece de sustitución de aminoácido en el sitio de fijación del receptor, lo cual tiene como resultado una sustitución de aminoácidos en la secuencia de la molécula 20 de HA que hace a la molécula de HA más antigénica respecto a los anticuerpos específicos que las moléculas de HA que carecen de la sustitución de aminoácidos.

Definiciones

25

[54] El término "virus de influenza" se usa en este documento para definir una especie viral de la cual las cepas patogénicas causan la enfermedad conocida como influenza o gripe.

[55] El término "virus de cepa maestra" se refiere a una cepa viral empleada en la construcción de cepas para vacuna, de alto crecimiento o atenuadas. Estas cepas maestras aportan, típicamente, seis segmentos de genes al virus de la vacuna (PB1, PB2, PA, NP, NA, M y NS). El virus de cepa maestra puede ser una cepa que también se use como componente de la vacuna, incluyendo la cepa del virus A/PR/8/34.

[56] El término "polipéptido" se refiere a un polímero de aminoácidos y no se refiere a una longitud específica del producto; entonces, péptidos, oligopéptidos y proteínas están incluidos en la definición de polipéptido. Este término tampoco se refiere a, o excluye, modificaciones post-translacionales del polipéptido, por ejemplo, glicosilación, acetilación, fosforilación y similares.

[57] Según se emplea en este documento, "infeccioso" se refiere a la habilidad de un virus para replicarse en una célula y producir partículas virales. La habilidad para infectar puede evaluarse bien sea detectando el virus, p.ej., carga viral o por observación del progreso de la enfermedad en el animal.

[58] Un "individuo" o "sujeto" o "animal" según se usa en este documento, se refiere a vertebrados que tienen una infección por virus ARN de una cepa negativa, específicamente infección por virus de influenza, que incluye, pero no está limitado a aves (como aves de agua y pollos) y miembros de especies de mamíferos tales como caninos, felinos, lupinos, mustélidos, roedores (racinos, murinos, etc), equinos, bovinos, ovinos, caprinos, especies de porcinos y primates, incluyendo los

últimos a los humanos. En una incorporación específica, el sujeto es un hurón, que es un buen modelo animal para el estudio de la influenza. En otra incorporación, el sujeto es un humano.

5

[59] Según se emplea en este documento, el término "inmunogénico" significa que el virus o polipéptido es capaz de producir una respuesta inmune humoral o celular y preferiblemente las dos. Una entidad inmunogénica también es
10 antigénica. Una composición inmunogénica es una composición que produce una respuesta inmune, humoral o celular, o ambas, cuando se administra a un animal.

[60] Una molécula es "antigénica" cuando es capaz de
15 interactuar específicamente con una molécula de reconocimiento de antígeno del sistema inmune, tal como una inmunoglobulina (anticuerpo) o célula T receptora de antígeno. Un polipéptido antigénico contiene un "epítipo" de por lo menos cerca de cinco, y preferiblemente por lo menos cerca de 10, aminoácidos.
20 Una porción antigénica de un polipéptido, también llamada en este documento el "epítipo", puede ser esa porción que es inmuno dominante para el reconocimiento del anticuerpo o de la célula T receptora, o puede ser una porción empleada para generar un anticuerpo a la molécula conjugando la porción
25 antigénica con un polipéptido portador para inmunización. Una molécula que es antigénica no debe ser ella misma inmunogénica, p. ej., capaz de provocar una respuesta de inmunidad sin un portador.

[61] Según se emplea en este documento, el término "sustitución de aminoácido" se refiere a la presencia de un aminoácido en una ubicación particular en la secuencia de aminoácidos de esa molécula. La sustitución de aminoácido sucede con relación a cualquier otro aminoácido que podría haber ocupado esa posición. El polipéptido que resulta del cambio en la secuencia de aminoácidos puede incluir cambios en modificaciones post-translacionales como glicosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones y cualquier otra modificación de aminoácidos así como sustituciones de aminoácidos.

[62] El término "sistema de genética inversa", como se usa en este documento, se refiere a métodos de generación de partículas de virus de influenza, polipéptidos, viriones o ácidos nucleicos por métodos de ingeniería genética. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, el "sistema de plásmidos" según lo describió Hoffman (Hoffman et al., Vaccine 2002, 20:3165; US Patent Publication 2002/0164770A, 7 November 2002, el cual por este medio se incorpora por referencia en su totalidad). Hablando en general, los sistemas de genética inversa permiten la creación de partículas de virus, polipéptidos, y/o ácidos nucleicos con secuencias específicas por métodos de ingeniería genética conocidos por los expertos en el arte. Estos sistemas se describen también con gran detalle más adelante.

[63] Según se emplea en este documento, el término "sitio de fijación del receptor" se refiere a la porción de la molécula de HA donde el receptor de interés, tal como el receptor de ácido siálico en un glóbulo rojo, se fija. La estructura de la

88
116

molécula H5 del A/duck/Singapore, y la ubicación del sitio de fijación del receptor para hemaglutinina del subtipo H5, es conocida y descrita (Ha et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2001 98:11181). El modelo molecular de esta HA del H5, incluyendo el
5 sitio de fijación del receptor, se muestra en la Figura 3.

[64] El término "virus de referencia para diagnóstico" se refiere a un virus con antigenicidad HA acrecentada. Tal virus de referencia para diagnóstico puede emplearse en un ensayo
10 inmunológico, p. ej., el ensayo de inhibición de la hemaglutinina.

[65] El término "virus de exposición" se refiere a un virus al cual se ha expuesto un individuo animal. Esta exposición puede
15 ser en el curso de las actividades normales, tal como el contacto con un sujeto infectado, p. ej., cuando se lleva a la exposición de un humano a un virus de influenza infeccioso. La exposición también puede ser debida a un compromiso clínico específico, como la situación de prueba en un laboratorio, en
20 la que un animal de laboratorio, tal como un hurón, se expone intencionalmente a un virus. Dicha exposición puede ser generada expresamente mediante inmunización con una vacuna de influenza.

25 [66] La frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que son tolerables fisiológicamente y para las que no es típico producir reacciones alérgicas o similarmente adversas, tales como molestias gástricas, mareos y similares, cuando se administran
30 a los humanos. De preferencia, como se ha usado en esto, el

87
117

término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno Federal o estatal o que aparece en la lista de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) o en la de otra farmacopea de reconocimiento general, para uso en animales y más particularmente en humanos.

[67] El término "portador" se refiere a un diluyente, coadyuvante, excipiente, o vehículo con el cual se administra el compuesto. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, como agua y aceites, incluyendo aquellos de origen sintético, vegetal, animal, o derivados del petróleo, tales como aceite de maní, aceite de soya, aceite mineral, aceite de ajonjolí y similares. El agua o las soluciones salinas acuosas y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol tienen uso preferencial como portadores, en particular para las soluciones inyectables. Descripción de portadores adecuados farmacéuticamente se encuentra en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W.Martin, 18th Edition.

[68] Según se emplea en este documento, el término "coadyuvante" se refiere a un compuesto o mezcla que resalta la respuesta inmune a un antígeno. Un coadyuvante puede servir como depósito de tejido que libera lentamente el antígeno y también como un activador del sistema linfático que resalta la respuesta inmune sin especificidad (Hood, et al., *Immunology, Second Ed.*, Menlo Park, CA: Benjamin/Cummings, 1984. p.384). A menudo, un primer reto con un solo antígeno, en ausencia de un coadyuvante, fallará al provocar una respuesta de inmunidad humoral o celular. Los coadyuvantes incluyen, pero no están limitados a: coadyuvante completo de Freund, coadyuvante

incompleto de Freund, saponinas, geles minerales como el hidróxido de aluminio, sustancia tensoactivas como lisolecitinas, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite o de hidrocarburos, hemocianinas de lapa Keyhole, y coadyuvantes potencialmente útiles para los humanos tales como la N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-nor-muramil-L-alanil-D-isoglutamina, N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina, BCG (*bacilo Calmette-Guerin*) y *Corynebacterium parvum*. De preferencia, el coadyuvante es aceptable farmacéuticamente.

[69] Según se emplea en este documento, el término "aislado" significa que el material en referencia se retira de su entorno nativo, p. ej., una célula o un virus. Así, un material biológico aislado puede estar libre de alguno o todos los componentes celulares, p. ej., componentes de las células en las que el material nativo se encuentra naturalmente (p. ej., componente de membrana o citoplásmico). Un material se considerará aislado si está presente en un extracto de células o flotando en la superficie. En el caso de moléculas de ácido nucleico, un ácido nucleico aislado contiene un producto PCR, un mRNA aislado, un cADN, o un fragmento de restricción. En otra incorporación, un ácido nucleico aislado se obtiene, de preferencia, por escisión del cromosoma en el cual puede encontrarse y con mayor preferencia si no está más unido o próximo a regiones no-codificadoras (pero puede estar unido a sus regiones reguladora nativas o porciones de ellas), o a otros genes, ubicados en las posiciones 5' y 3' del gen que está contenido en la molécula aislada de ácido nucleico cuando

9/19

se encuentra en el cromosoma. En otra incorporación más, el ácido nucleico aislado carece de uno o más intrones. Las moléculas de ácido nucleico aislado contienen secuencias insertadas en plásmidos, cósmidos, cromosomas artificiales y similares, p. ej., cuando hace parte de una construcción quimérica de ácido nucleico recombinante. Así, en una incorporación específica, un ácido nucleico recombinante es un ácido nucleico aislado. Una proteína aislada puede asociarse con otras proteínas o con ácidos nucleicos, o ambos, con lo cual se asocia en la célula, o con membranas celulares si es una proteína asociada a la membrana. Un organelo, célula o tejido aislado está retirado del sitio anatómico en el que se encuentra en un organismo. Un material aislado puede ser, pero no necesita ser, purificado.

15

70 El término "purificado" según se emplea en este documento, se refiere a material que ha sido aislado bajo condiciones que reducen o eliminan la presencia de materiales no relacionados, p. ej., contaminantes, incluyendo materiales nativos a partir de los cuales se ha obtenido el material. Por ejemplo, un virión purificado es, de preferencia, sustancialmente libre de células del huésped o componentes de cultivo, incluyendo cultivos de tejidos o proteínas de huevo, patógenos no específicos y similares. Según se emplea en este documento, el término "sustancialmente libre" se emplea operacionalmente, en el contexto del ensayo analítico del material. De preferencia, el material purificado sustancialmente libre de contaminantes es por lo menos 50% puro, más preferiblemente por lo menos 90% puro y aún más preferiblemente por lo menos 99% puro. La pureza puede evaluarse por cromatografía, electroforesis en gel,

30

92
120

ensayos inmunológicos, análisis de composición, ensayos biológicos, y otros métodos conocidos en el arte.

[71] Los métodos de purificación son bien conocidos en el
5 oficio. Las partículas virales pueden purificarse por ultra
filtración o ultra centrifugación, de preferencia
centrifugación continua (ver Furminger, *supra*). Otros métodos
de purificación son posibles y se contemplan aquí. Un material
purificado puede contener menos de cerca del 50%,
10 preferiblemente menos del 75% y más preferiblemente menos del
90%, de componentes celulares, medios, proteínas y otros
componentes no deseables o impurezas (según requisitos del
contexto) con los cuales estuvo asociado originalmente. El
término "sustancialmente puro" indica el grado más alto de
15 pureza que puede lograrse usando técnicas convencionales de
purificación conocidas en el oficio.

[72] En una incorporación específica, el término "cerca" o
"aproximadamente" significa dentro del rango estadísticamente
20 significativo para un valor. Tal rango puede estar dentro de
un orden de magnitud, preferiblemente dentro del 50%, más
preferiblemente dentro del 20%, aún más preferiblemente dentro
del 10% y todavía más preferiblemente aún dentro del 5% de un
valor o rango dado. La variación permitida abarcada por los
25 términos "cerca" o "aproximadamente" depende del sistema
particular en estudio, y puede ser fácilmente apreciada por
alguien de mediana destreza en el oficio.

Hemoglutinina

[73] La Hemoglutinina (HA) es la mayor glicoproteína de la
30 envoltura de los virus de la influenza A y B. La Hemoglutinina-

93
121

estearasa (HE) de los virus de influenza C es el homólogo de la HA en esos virus. Nuevos subtipos de las moléculas HA, introducidos típicamente desde aves acuáticas, conocidas por ser reservorios naturales de virus de influenza, dan como
5 resultados pandemias de influenza (ver Suzuki and Nei, Mol. Biol. Evol. 2002; 19(4): 501-509).

[74] El HA contiene dos cadenas de polipéptidos, HA1 y HA2, codificadas por un sólo gen y obtenidas por proteólisis de una sola molécula precursora, incluida la pérdida de un péptido
10 señal (Suzuki and Nei, *supra*; Air, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1981; 78(12): 7639-7643). El HA1 tiene cerca de 320 aminoácidos, y su proteína fijadora del receptor y el mayor objetivo de respuestas inmunes. El HA2 tiene cerca de 220 aminoácidos, y provee sujeción a la envoltura viral (Suzuki and
15 Nei, *supra*).

[75] Los genes HA de la influenza A se clasifican en 16 subtipos, de acuerdo con sus propiedades antigénicas. Los genes HA y (HE) de los virus de influenza B y C no están
20 clasificados en subtipos. Las secuencias de los subtipos de influenza H1 a H15 y de influenza B y C, HA (HE), se muestran en Suzuki and Nei, *supra*, Figura 1, que se incorpora como referencia. En la Figura 1 de Air, *supra*, que se incorpora como referencia, se muestra una comparación de las secuencias de la
25 influenza A Ha, subtipos H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11 y H12 incluyendo los residuos de aminoácidos conservados para todos los subtipos. Ambas referencias revelan las cepas de las cuales se obtuvieron las secuencias.

[76] Las nuevas moléculas HA del invento se crean introduciendo cambios en la secuencia de aminoácidos de la molécula HA que tiene como resultado aumento en antigenicidad. El aislamiento de los ácidos nucleicos que codifican tales moléculas de HA es rutina (ver Air, *supra*), como lo es la modificación del ácido nucleico para introducir cambios en la secuencia de aminoácidos, p. ej., por mutagénesis dirigida a un sitio.

[77] En una incorporación alternativa, las moléculas HA de una cepa de un subtipo particular de HA ya contienen una secuencia de aminoácidos que aumenta su antigenicidad en relación con moléculas HA de los mismos subtipos de una cepa diferente, como se ejemplificó aquí con respecto al A/HK/213/03, en relación, p. ej., con el A/Vietnam/1203/04. En este caso, la cepa de influenza con la molécula HA más antigénica podría servir como una cepa de referencia para diagnóstico. En otra incorporación, los residuos de aminoácidos del HA más antigénico pueden ser introducidos o sustituidos dentro de la secuencia de la molécula de HA menos antigénica para convertirla en una molécula HA de antigenicidad aumentada.

[78] Varios cambios en la secuencia de una molécula HA pueden tener como resultado un aumento de antigenicidad. Como se anotó antes, la cadena HA1, que es el dominio de fijación del receptor y el mayor objetivo de respuesta de inmunidad es la cadena en las que tales cambios pueden hacerse. Los cambios pueden aumentar la afinidad de los anticuerpos por la molécula HA, p. ej., por eliminación de un sitio de glicosilación que forma un epítopo, o favoreciendo una conformación con afinidad aumentada para la fijación de anticuerpos. Alternativamente, el

cambio puede tener como resultado una fijación disminuida al receptor HA, p. ej., un receptor de ácido siálico en un glóbulo rojo, haciendo a los anticuerpos específicos de la molécula HA competidores más efectivos para la reacción de la hemaglutinina. Los varios ensayos inmunológicos capaces de demostrar esos cambios, incluyendo el ensayo de inhibición de la hemaglutinina (HI), son bien conocidos en el arte.

[79] El ensayo de HI involucra partículas del virus de influenza completas, como lo hacen las vacunas actuales. Así, el invento provee virus de influenza con moléculas HA de antigenicidad aumentada. Tales virus se generan, para mejor conveniencia, mediante un abordaje de "genética inversa", aunque también es posible usar el reordenamiento clásico.

15

Métodos de Genética Inversa

[80] Los sistemas de genética inversa desarrollados recientemente han permitido la manipulación del genoma del virus de la influenza (Palese et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996,93:11354; Neumann and Kawaoka, Adv. Virus Res. 1999, 96:9345; Fodor et al., J. Virol. 1999, 73:9679; US Patent Application 20040029251). Por ejemplo, se ha demostrado que la expresión dirigida por plásmidos de 8 vARN de influenza de un promotor pol I y todos los mARN de un promotor pol III tiene como resultado la formación de virus de influenza A infecciosos (Hoffmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2000, 97:6108; US Patent Publication No. 20020164770, que se incorpora como referencia por su descripción de un sistema mínimo de genética inversa de plásmidos, y por su descripción de métodos de ingeniería genética). Estos métodos recombinantes permiten la

96
134

producción específica de virus de influenza con alteraciones específicas en los polipéptidos de la secuencia de aminoácidos. Una molécula HA que contiene la sustitución deseada puede ser parte de un virus de influenza recombinante. El virus de influenza recombinante puede hacerse por cualquier medio conocido por aquellos que tienen experiencia en el oficio, inclusive por medio de un método de ingeniería genética tal como el sistema de "solamente plásmido" (Hoffmann et al., Vaccine 2002, 20:3165). El virus de influenza recombinante puede obtenerse de un virus H5N1. El virus recombinante puede tener el antecedente genético de un virus H1N1 empleado en desarrollo de vacunas tal como el virus A/PR/8/34 o cualquier virus de influenza A, incluyendo cepas adaptadas al frío de A/Leningrad/134/17/57, A/Leningrad/134/47/57 y A/Ann Arbor/6/60. El ácido nucleico correspondiente a la secuencia de la molécula HA puede ser aislado del virus y puede ser establecido el orden de sus constituyentes.

[81] Las técnicas para aislar y modificar ácidos nucleicos específicos y proteínas son bien conocidas por aquellos que tienen práctica en el oficio. De acuerdo con la presente invención se pueden emplear técnicas convencionales de biología molecular, microbiología y ADN recombinante dentro de las destrezas del oficio. Tales técnicas están explicadas ampliamente en la literatura. Ver, p. ej., Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 (Aquí "Sambrook et al., 1989"), *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volumes I and II (D.N. Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait ed. 1984); *Nucleic Acid*

Hybridization (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985));
 Transcription And Translation (B.D. Hames & S.J. Higgins eds.
 (1984)); Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed.(1986));
 Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, (1986)); B. Perbal, A
 5 Practical Guide To Molecular Cloning (1984); Ausubel, F.M. et
 al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley
 & Sons, Inc., 1994. Estas técnicas incluyen mutagénesis
 dirigida a un sitio empleando oligonucleótidos con nucleótidos
 alterados para obtener productos PCR con mutaciones (p. ej., el
 10 conjunto de "cambio rápido" producido por Stratagene).

Ensayos Inmunológicos

[82] De acuerdo con el presente invento, varios medios
 conocidos en el oficio, para detectar la fijación
 inmuno-específica de un anticuerpo y un antígeno, pueden ser
 15 empleados para detectar la fijación y la antigenicidad
 aumentada. Un método primitivo para detectar la interacción
 entre un antígeno y un anticuerpo incluía detección y análisis
 del complejo por precipitación en geles. Un método posterior
 para detectar la fijación de un par analito-detector anticuerpo
 20 contempla el empleo de anticuerpo detector radioyodado o una
 proteína radioyodada que es reactiva con la IgG, tal como la
 proteína A. Estos métodos os son bien conocidos por personas
 con práctica en el oficio, según la revisión en Methods in
 Enzymology 1980, 70:166-198.

25

[83] Métodos posteriores para determinar la presencia de un
 analito en una muestra empleando sólo un anticuerpo incluyen
 ensayos de fijación competitiva. En ésta técnica el anticuerpo,
 que muy a menudo sería inmovilizado en un soporte sólido, sería
 30 expuesto a una muestra de la que se sospecha contiene el

98
126

analito junto con una cantidad conocida de analito marcado. Los dos analitos, el analito marcado y el analito en la muestra, competirían entonces por sitios de fijación en el anticuerpo. Cualquiera, el analito marcado como libre, o el analito marcado como fijado, es determinado y a partir de ésta medida se conoce la cantidad de analito competidor en la muestra. Una descripción más completa de este método está publicada en "Basic Principles of Antigen-Antibody Reaction" (Labat, Methods in Enzimology, 70, 3-70, 1980). En este ejemplo, el analito marcado puede serlo con un radioisótopo o con una enzima.

[84] Los ensayos inmunológicos más corrientes usan un método de doble anticuerpo para detectar la presencia de un analito. Estas técnicas también están revisadas en el Volumen de Métodos en Enzimología mencionado arriba. Por consiguiente, de acuerdo con una incorporación de la presente invención, la presencia de los marcadores individuales se determina empleando un par de anticuerpos por cada uno de los marcadores a detectar. A uno de los dichos pares de anticuerpos se hace referencia en este documento como un "anticuerpo detector" y al otro de los dichos pares se hace referencia en este documento como "anticuerpo de captura". Así, una incorporación del presente invento emplea el método de emparedado de anticuerpo doble para detectar un analito en una muestra de fluido biológico. En este método, el analito es emparedado entre el anticuerpo detector y el anticuerpo de captura, estando el anticuerpo de captura irreversiblemente inmovilizado en un soporte sólido. El anticuerpo detector podría contener una marca detectable, para identificar la presencia del emparedado anticuerpo-analito y así, la presencia del analito.

99
123

[85] Las formas iniciales comunes de soportes incluyen placas, tubos o bolitas de poliestireno, todos los cuales son bien conocidos en el campo de análisis radioinmunológico y el análisis inmunológico con enzimas. Más recientemente, se han
5 empleado como soportes sólidos materiales porosos como nilón, nitrocelulosa, acetato de celulosa, fibras de vidrio, y otros polímeros porosos.

[86] Se pueden emplear varias técnicas y los correspondientes
10 dispositivos sensores. Los aparatos para análisis automatizados incluyen aparatos para análisis de acceso continuo/aleatorio. Los ejemplos de tales aparatos incluyen OPUS™ de PB Dignostic System, Inc. y el Analizador IMX™ introducido por Abbott Laboratories of North Chicago, Ill. Los instrumentos de
15 análisis automatizado de PB Diagnostic Systems, Inc. están descritos en US Pat. Nos. 5,051,237; 5,138,868; 5,141,871 y 5,147,609.

[87] Nuevas clases de sistemas de analizadores inmunoquímicos,
20 que pueden emplearse en la práctica de la presente invención, son los sistemas de inmunosensores ópticos. En general, un inmunosensor óptico es un dispositivo que emplea los principios ópticos cuantitativamente para convertir en señales eléctricas concentraciones o actividades de interés, químicas o
25 bioquímicas. Estos sistemas pueden agruparse en cuatro categorías principales: técnicas de reflexión; resonancia de plasmón superficial; técnicas de fibra óptica y dispositivos ópticos integrados. Las técnicas de reflexión incluyen elipsometría, espectroscopía de reflexión integral múltiple, y
30 dispositivos para relleno capilar fluorescente. Las técnicas de

fibra óptica incluyen fluorescencia de campo evanescente, tubo capilar de fibra óptica, y sensores de fluorescencia de fibra óptica. Los dispositivos ópticos integrados incluyen fluorescencia de campo evanescente, tubo capilar de fibra
 5 óptica, y sensores de fluorescencia óptica de fibra. Los dispositivos ópticos integrados incluyen fluorescencia de campo evanescente con planeador, inmunosensor de acople con gradiente de entrada, interferómetro de Mach-Zehnder, interferómetro de Hartman y sensores de interferómetro de diferencia. La
 10 detección holográfica de reacciones de fijación se logra detectando la presencia de una imagen holográfica que es generada en una ubicación predeterminada para la imagen cuando un reactante de un par de fijación se fija en un segundo reactante inmovilizado del par de fijación (ver US Pat. No.
 15 5,352,582, emitida en Oct. 4, 1994, a Lichtenwalter et al.). Ejemplos de inmunosensores ópticos se describen en general en el artículo de revisión de G. A. Robins, Advances in Biosensors 1991, 1:229-256. Descripciones más específicas de estos dispositivos se encuentran, por ejemplo, en U.S. Pat.Nos.
 20 4,810,658; 4,978,503; y 5,186,897; R. A. Brady et al.(Phil. Trans. R. Soc. Land. B. 1987, 316:143-160) y G. A. Robinson et al. (in Sensors and Actuators, Elsevier, 1992).

[88] Los análisis serológicos se usan ampliamente en el
 25 diagnóstico de influenza así como en estudios de investigación relacionados con epidemiología y antigenicidad de las cepas virales. En particular, el análisis de inhibición de la hemaglutinina (HI) se usa ampliamente debido a sus mínimos requerimientos de laboratorio y facilidad de uso. Está
 30 contemplado que el invento mejorará la aplicabilidad del

análisis de HI al aumentar su sensibilidad. El análisis de HI también puede usarse para mostrar la antigenicidad de la molécula modificada de HA, y para ayudar en la caracterización de la molécula modificada de HA como más o menos antigénica que
5 moléculas no modificadas.

[89] El análisis de HI determina la habilidad de los anticuerpos de una muestra de suero para fijarse en una referencia estandarizada. En el análisis de HI, diluciones
10 seriadas (títulos) de la muestra de suero se mezclan con cantidades estándar de eritrocitos y su asociación en forma de complejos se detecta visualmente. El nivel mínimo de suero titulado que muestra un complejo visible es el resultado del análisis.

15

[90] Como se anotó arriba, el presente invento permite la producción mejorada y la validación de vacunas para tratar o prevenir infecciones virales por influenza. En particular, el invento actual es aplicable a vacunas producidas mediante el
20 uso de técnicas de genética inversa. Está contemplado que el invento será útil en la validación y verificación de la respuesta inmune después de la vacunación. En particular, pero no exclusivamente, el invento aporta a la detección mejorada de anticuerpos después de que un individuo ha sido expuesto a un
25 virus de influenza a causa de la antigenicidad incrementada de la molécula de HA modificada. Esta antigenicidad incrementada se refleja en el aumento de la sensibilidad del análisis empleado para detectar la respuesta inmune, tal como el análisis de HI.

30

102
130

[91] Según se ejemplifica adelante, un virus modificado que contiene una molécula HA de antigenicidad aumentada es, en sí mismo, más inmunogénico, lo cual, a su turno prepara una respuesta inmune más fuerte y mejor potencial de la vacuna.

5

[92] Las estrategias para aumentar la efectividad de las vacunas para la influenza incluyen el uso de coadyuvantes (Wood and Williams, *supra*), co-administración de moléculas inmunoestimulantes (Salgaller and Lodge, J. Surg. Oncol. 1998, 10 68:122) y estrategias de vacunación en mucosas. La estrategia de inmunización en mucosas incluye la encapsulación del virus en microcápsulas (U.S. Patents No. 5,075,109, No. 5,820,883, and No.5,853,763) y el uso de un portador membranoso inmunopotenciador (WO98/0558). Adicionalmente, la 15 inmunogenicidad de los inmunógenos administrados por vía oral puede ser resaltada mediante el empleo de glóbulos rojos (RBC) o RBC fantasmas (U.S. Patent No. 5,643,577) o con el empleo de antígeno azul de la lengua (U.S. Patent No. 5,690,938). Aunque estos esquemas son promisorios para mejores estrategias futuras 20 de vacunación, su empleo en situaciones específicas requiere validación y vigilancia para asegurar la efectividad de la vacuna. Está contemplado que el invento descrito aquí resaltará estas estrategias incluyendo el aumento en la habilidad para detectar efectos inmunogenéticos.

25

EJEMPLOS

[93] Los siguientes ejemplos ilustran varios aspectos del 30 invento, pero no intentan limitarlo.

703
131

Ejemplo 1: Títulos de anticuerpos en sueros de hurones inoculados

[94] Virus H5N1 altamente patógenos se obtuvieron de
5 laboratorios que colaboran en Asia con la Organización Mundial
de la Salud (OMS). Todo el trabajo con esos virus se efectuó en
las instalaciones BL3+ en el hospital St Jude Children's
Research. Para comparar la inmunogenicidad de los virus de
influenza del genotipo Z del 2003, el cual se convirtió en
10 dominante en el 2004, con la de los virus del 2004, inoculamos
los hurones con el virus H5N1 aislado de un caso humano fatal
(A/HK/213/03) (Guam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2004,
101:8156) y con cuatro virus H5N1 aislados de humanos, gallinas
y halcones en el 2004 (Fig. 1A). Hurones exogámicos machos y
15 hembras se obtuvieron por medio de un programa de cruzamiento
especial del Centro de Recursos Animales del hospital St Jude
Children's Research. Los animales tenían de 3 a 5 meses de
edad y eran seronegativos a exámenes de HI por exposición a los
virus de influenza A H1N1, H3N2, y H5N1 y a los virus de
20 influenza B de circulación actual. Los virus fueron propagados
durante 48 horas, a 35°C, en las cavidades alantoicas de huevos
de gallina con embriones de 10 días. El fluido alantoico
extraído después de solo un paso en huevos de gallina con
embrión se congeló a -80°C y se usó en experimentos. Los
25 anticuerpos del suero fueron titulados por análisis de HI con
virus puestos en prueba después de 28 días de inoculados. El
virus A/HK/213/03 indujo títulos de anticuerpos altos (1:640 -
1:1280), mientras que las cuatro cepas del 2004 indujeron
títulos de HI muy bajos (1:20 - 1:40).

104
132

[95] Los títulos de HI relativamente bajos de los virus H5N1 de 2004 pudieron haber sido el resultado de supresión general de la inmunidad inducida por virus. Sin embargo, el resultado de la vacunación con vacunas Δ H5N1-A/PR/8/34 (6+2) que incluyen el HA y la neuraminidasa del A/HK/213/03 y del A/Vietnam/1203/04 indicó que las diferencias en el H5 podrían ser una contribución mayor para este efecto (Fig. 1B). La vacunación con dos dosis separadas de 7 μ g de vacuna de Δ H5N1/03 indujo niveles altos de anticuerpos en suero detectables en análisis tanto de HI como de neutralización de virus (Fig. 1B). Después de la vacunación idéntica con Δ H5N1/04 se detectaron muy bajos títulos (1:20) en el análisis de HI, mientras que los títulos de neutralización fueron mucho más altos (alrededor de la mitad que los inducidos por Δ H5N1/03). Estudios previos hallaron que la vacuna inactivada obtenida del A/duck/Singapore/3/97 (H5N3) indujo pocos o no detectables anticuerpos en suero (Nicholson et al., Lancet 2001, 357:1937; Stephenson et al., Vaccine 2003, 21:1687). Considerados juntos, esos resultados indican que algunos aislados del HI pueden tener inusuales propiedades inmunogénicas y / o antigénicas. El alineamiento de las secuencias del aminoácido de H5 reveló que los HA de los virus A/HK/213/03 y A/Vietnam/1203/04 difieren en 10 aminoácidos en la región HA1 (Tabla 1b). El virus A/Vietnam/1203/04 tiene un sitio de glicosilación potencial en la asparagina N₁₅₄ (N⁺₁₅₄-S₁₅₅-T₁₅₆, N-X-S/T, X $\neq$ P). La comparación de secuencias reveló tres aminoácidos (S₁₂₀, K₁₈₉, y S₂₂₃) que estaban presentes en todos los virus 2004 pero que no estaban presentes en el A/HK/213/03. El K₂₁₂ fue característico para el virus A/Vietnam/1203/04.

105
133

Ejemplo 2: Generación y caracterización antigénica de los virus

ΔH5- A/PR/8/34 recombinantes

5 [96] Para probar el impacto de los aminoácidos identificados en la inmunogenicidad y la protección contra la amenaza de los virus, usamos el sistema de genética inversa de los 8 plásmidos para generar virus recombinantes con siete segmentos de genes de A/PR/8/34 y el segmento del gen HA del A/Vietnam/1230/04 que
10 contiene mutaciones en solo un punto (Hoffmann et al., Vaccine 2002, 20:3165). Los virus recombinantes presentaron carencia de patogenicidad por modificación de la HA del H5 en el sitio de segmentación generado por transfección del ADN. Las mutaciones puntuales fueron insertadas en el gen HA durante la PCR
15 (Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)) por el uso del equipo QuikChange® Site-Directed Mutagenesis (Stratagene, Cedar Creeek, TX, USA) y un grupo de cebadores específicos de la HA del H5. Los virus reordenados contienen el gen HA o los genes HA y neuraminidasa (NA) de los
20 virus H5N1 en los antecedentes genéticos del virus A/PR/8/34 (H1N1) (Ver la tabla 1a para los virus generados para este estudio y sus nombres abreviados). Fluido alantoico extraído después de solo un paso en huevos de gallina con embrión se congeló a -80 °C y se usó en experimentos. Los genes HA de los
25 virus recombinantes fueron ampliados por RT-PCR y ordenados en serie para verificar que solo las mutaciones designadas estuvieran presentes. El cambio de aminoácido fue verificado por el orden serial del segmento de HA de los virus recombinantes (Tabla 1a).

106
134

[97] Para evaluar las propiedades antigénicas y la diversidad de los HA recombinantes, llevamos a cabo ensayos de HI con un panel de 6 anticuerpos monoclonales anti-HA (Tabla 2). Los anticuerpos monoclonales (mABs) CP24, CP46, CP58 y 406/7 al HA del virus A/chicken/Pennsylvania/1370/83 (H5N3) fueron producidos en el Departamento de Enfermedades Infecciosas del hospital St. Jude Children's Research. Fueron preparados con una modificación al método descrito por Kohler y Milstein el MAb VN04-6 al HA del virus A/Vietnam/1203/04 y el mAb HK03-3 al HA del virus A/HK/213/03 (Kaverin et al., Journal of Virology 2004, 78:240; Kohler et al., European Journal of Immunology 1976, 6:511). Cinco mAb reaccionaron a títulos relativamente altos con el virus Δ H5N1/03, pero solo 3 reaccionaron con el Δ H5/04 HA. Las pautas de reactividad de los virus Δ H5_{S155-N}, T156-A/04, Δ H5_{S120-N}/04 y Δ H5_{R212-K}/04 fueron similares, en general, a aquellas del virus Δ H5/04. Las reacciones del virus Δ H5_{S120-N}, S155-N, T156-A/04 fueron similares a aquellas del virus Δ H5N1/03. Cuatro mAb reconocieron al Δ H5/04 HA con la mutación S223-N (Δ H5_{S223-N}/04). La mutación inversa N223-S en el HA del virus (Δ H5_{N223-S}/03) de 2003 tuvo como resultado disminuciones significativas de los títulos de HI, o pérdida de reconocimiento de los mAbB.

Ejemplo 3: Pruebas de HI con glóbulos rojos de caballo y pollo

[98] Otra observación interesante fue obtenida en una prueba de HI con glóbulos rojos de pollo y caballo (RBC). Interesantemente, el virus Δ H5_{S223-N}/04 recombinante fue menos capaz para aglutinar 1% de RBC de caballo, pero aglutinó RBC de

pollo a un título alto (1:1024). Ninguno de los virus recombinantes restantes difirió en su reacción a RBC de pollo y caballo en la misma extensión.

**Ejemplo 4: Vacunación de hurones con virus recombinantes
mutantes H5**

[99] Determinamos la inmunogenicidad y la eficacia de la protección de las vacunas inactivadas por vacunación de grupos de 3 hurones con inyección intramuscular con preparaciones de los virus $\Delta H5N1/04$, $\Delta H5/04$, $\Delta H5_{S155-N}$, $T156-A/04$, $\Delta H5_{S120-N}/04$ y $\Delta H5_{S223-N}/04$ estandarizados por el contenido de HA. Se usó la técnica de inmunodifusión radial sencilla para estandarizar el $\Delta H5N1/03$. (Webby et al., Lancet 2004, 363:1099). Los restantes virus recombinantes fueron separados por electroforesis en gel de poliacrilamida con 12% de SDS, los geles manchados fueron analizados por densitometría en el analizador de imagen luminiscente FUJIFILM LAS-1000plus, y el HA fue cuantificado por comparación con una preparación de proteína de referencia. Después de recibir dos inyecciones de 7 μg de HA cada animal fue inoculado con A/Vietnam/1203/04 (H5N1). Grupos de 3 hurones fueron vacunados por inyección intramuscular de 250 μl de PBS estéril que contenían 7 μg de HA de virus purificados inactivados. Los virus para vacuna fueron inactivados, concentrados y purificados como se describe. (Liu et al., Virology 2003, 314:580; Webby et al., Lancet 2004, 363:1099) Tres animales de control fueron inyectados con 250 μl de PBS estéril solamente. En el día 21 después de la vacunación se extrajeron sueros y se les aplicó una segunda inyección intramuscular de 7 μg de HA. Dos semanas más tarde, de nuevo se les extrajo suero y los animales fueron inoculados con el virus en prueba.

108
136

[100] Los animales vacunados y de control fueron inoculados intranasalmente, como se describió previamente, con dosis infecciosas medias 10^6 (EID₅₀) del virus A/Vietnam/1230/04 (Govorkova et al., Journal of Virology 2005, 79:2191). Signos
5 clínicos de la infección, peso corporal y temperatura fueron monitoreados a diario por dos semanas. Los Hurones que mostraron signos de enfermedad extrema fueron sacrificados. Para estimar la respuesta de inmunización post-infección, grupos adicionales de hurones fueron inoculados con 10^6 EID₅₀ de
10 H5N1 de aves y de humanos aislados de los A/HK/213/03, A/Vietnam/3046/04, A/Vietnam/3062/04, A/chicken/Vietnam/39/04 y A/falcon/HK/D0028/04. Se extrajeron sueros de los animales en el día 28 después de la inoculación. En orden a determinar los títulos de los virus en el tracto respiratorio superior, los
15 especímenes se obtuvieron por lavados nasales en los días 3, 5, y 7 (Govorkova et al., Journal of Virology 2005, 79:2191). Se tituló el virus de las muestras en huevos de gallina con embriones de 10 días y se expresó como Log₁₀ EID₅₀ por 0.1 ml. Los lavados nasales de todos los animales vacunados mostraron
20 títulos de virus de 2.5-4.5 Log₁₀ EID₅₀ en el día 3; 0.5-2.5 Log₁₀ EID₅₀ en el día 5 y 0.5 Log₁₀ EID₅₀ en el día 7 (Fig. 2). Los hurones no vacunados tuvieron un título promedio de 4.0 Log₁₀ EID₅₀ una semana después de la infección. Dos de los tres hurones de control desarrollaron signos de enfermedad severa
25 (pérdida masiva de peso y parálisis) y se les sometió a eutanasia y otro murió de la infección. Solo uno de los hurones vacunados llegó a estar seriamente enfermo. Este hurón vacunado con el virus AH5_{S120-N}/04 mostró signos neurológicos severos y fue sometido a eutanasia en el día 7 después de la
30 inoculación. Este hurón había mostrado conjuntivitis viral

109
137

severa el día 4 después de la inoculación, con la subsiguiente propagación del virus al cerebro. Es posible que el virus fuera transferido a los ojos durante el lavado nasal en el día 3 y que la rápida propagación neuronal al cerebro causara 5 encefalitis. El resto de los hurones vacunados demostraron actividad decreciente, pérdida de peso corporal, incremento de la temperatura corporal durante los primeros 3 días después de la amenaza viral. Esos signos desaparecieron hacia el día 5 y todos los animales se recuperaron rápidamente. Así, todos los 10 virus de vacuna probados protegieron a los hurones de la amenaza letal del A/Vietnam/1203/04. La vacunación disminuyó los títulos de los virus en el tracto respiratorio superior y disminuyó la duración de la difusión viral.

15 Ejemplo 5: HI y Pruebas de neutralización de la inmunogenicidad de los virus recombinantes

Δ H5-A/PR/8/34

[101] Sueros de hurones vacunados se analizaron contra los virus recombinantes en ensayos de HI y neutralización de virus 20 (Tablas 3 y 4 respectivamente). Sueros extraídos de hurones fueron tratados durante la noche con enzimas de Vibrio Cholera destructoras de los receptores (Denka-Seiken, Tokio, Japan), desactivados térmicamente a 56°C por 30 minutos y adsorbidos con suspensión al 0.5% de eritrocitos de pollo (CRBC). Pruebas 25 estándar de HI y de neutralización de virus en celdas MDCK fueron hechas como se describió previamente. (Palmer et al., US Department Of Health, Education and welfare, Immunology series no. 6. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention. 1975; Kida et al., Virology 1982 122:38).

110
138

[102] Se usaron cuatro unidades de hemaglutinante (HAU) de virus en cada ensayo de HI y 100 dosis medias de cultivo de tejidos infecciosos (TCID₅₀) se usaron en cada ensayo de neutralización. Sueros de hurones vacunados con virus con reordenante de gen sencillo de tipo silvestre (Δ H5/04, virus de referencia) produjeron títulos de HI de 1:20. El construido, en el cual el sitio de glicosilación fue removido (Δ H5_{S155-N, T156-A}/04), indujo títulos de HI de 1:10-1:20. La mutación Δ H5_{HA_{S120-N}}/04 tuvo como resultado títulos de HI de 1:20 a 1:80. En contraste la vacunación con Δ H5_{S223-N}/04 tuvo como resultado títulos de HI de 1:640 y los otros sueros inmunizados probados reaccionaron con Δ H5_{S223-N}/04 a títulos altos de HI (1:160 a 1:320). Por lo tanto, aunque la vacunación indujo una protección por inmunización, los niveles detectables de anticuerpos fueron diferentes.

[103] Todos los virus Δ H5/04 produjeron títulos altos de anticuerpos de neutralización de virus después de la vacunación (1:320 a 1:1280) (Tabla 4). No se observaron diferencias sustanciales entre títulos de neutralización homólogos y heterólogos. Por lo tanto las diferencias observadas entre los antisueros en el reconocimiento del HA no reflejaron la habilidad de los anticuerpos para neutralizar los virus.

25 Ejemplo 6: Reactividad de los virus recombinantes

[104] Para evaluar adicionalmente la reactividad de los virus recombinantes usamos ensayos de HI para probar los sueros hiperinmunes de pollo y ratón obtenidos después de la vacunación con los virus Δ H5N1/03 y A/HK/213/03 contra los

HH
139

virus recombinantes con HA alterados (Tabla 5). El promedio de los títulos de HI a los virus $\Delta H5N1/03$ homólogos fue de 1:2560. Los títulos de HI a $\Delta H5/04$ fueron 1:160. Los títulos de HI contra el virus $\Delta H5_{S223 \rightarrow N}/04$ recombinante fueron por lo menos el doble de los títulos contra otros mutantes.

[105] Para obtener información adicional a cerca de la contribución del aminoácido en la posición 223 a la reactividad serológica, generamos un virus recombinante en el cual el H5 se obtuvo del A/HK/213/03 con solo la mutación de punto $N_{223} \rightarrow S$ (Tabla 1a). Este virus $\Delta H5N_{223 \rightarrow S}/03$ recombinante tuvo títulos de HI más bajos en RBC de caballo y pollo que los del virus $\Delta H5N1/03$. Para caracterizar aún más el impacto del aminoácido 223 en el reconocimiento del antígeno-anticuerpo generamos virus recombinantes que contenían el HA tipo silvestre y la mutación $S_{223} \rightarrow N$ HA del A/duck/Singapore/3/97 (ver Tabla 1a). Estos virus fueron probados con ensayos de HI contra un panel de antisueros de anti H5 y mAb (Tabla 6). La sustitución $S_{223} \rightarrow N$ en el HA aumentó dramáticamente los títulos de HI (por un factor de 4 o más). Sin embargo esta mutación no alteró significativamente la pauta de reacción del A/duck/Singapore/3/97 HA, especialmente en la reacción con mAb: ni el original, ni el HA mutante reaccionaron con mAb HK03-3 y CP46, y, ambos reaccionaron a un título bajo con CP46 (Tabla 6). Estos resultados demuestran que la sustitución $S_{223} \rightarrow N$ en el HA aumenta la sensibilidad del ensayo del HI.

Ejemplo 7: Virus de referencia de segunda generación para diagnóstico previstos para incrementar la sensibilidad del

ensayo de HI

112
140

[106] Previamente hemos demostrado en el Ejemplo 3 que convirtiendo el aminoácido en la posición 223 de la HA del H5 a asparagina se incrementó la sensibilidad de la prueba de HI usando glóbulos rojos de pollo. Hemos suministrado evidencia de que la base molecular de este efecto se originó en una alteración de la especificidad del receptor. El virus mutante con la sensibilidad incrementada no aglutinó glóbulos rojos de caballo que solo tienen una conexión alfa 2,3. Por lo tanto, los cambios en el aminoácido que resultan en la inhabilidad para aglutinar glóbulos rojos de caballo son candidatos con potencial de sensibilidad incrementada en el ensayo de HI usando glóbulos rojos de pollo. Este concepto puede ser aplicado a todos los 16 subtipos de HA, especialmente en los virus de la influenza A aviar que tienen la especificidad 2,3.

15

[107] Técnicas de genética inversa permiten la generación de virus recombinantes los cuales tienen cambios menores en sus estructuras antigénicas pero son "optimizados" en el reconocimiento de diferentes sustratos celulares. Son mutados preferiblemente los aminoácidos (91, 130-134, 149, 151, 179, 186, 190-191, 220-225, para el H5) que están cerca o son parte del sitio de fijación del receptor. Pueden construirse plásmidos de HA con ingeniería genética y pueden generarse virus por cotransfección. Los virus recombinantes pueden ser probados con ensayos de HA usando glóbulos rojos de pollo y paralelamente con glóbulos rojos de caballo. Los virus candidatos que aglutinan glóbulos rojos de pollo pero que no aglutinan glóbulos rojos de caballo, serán candidatos para probar en análisis de HI. En experimentos complementarios se generan virus que aglutinan glóbulos rojos de caballo pero que

30

~~113~~
141

no aglutinan glóbulos rojos de pollo. La combinación de
candidatos con cambio sencillo de amino puede aumentar
adicionalmente la sensibilidad. Se espera que la evaluación de
candidatos conduzca a virus de referencia para diagnóstico con
5 reactividad específica a receptores con especificidad 2,3.

21

Tabla 1a. Virus recombinantes H5-PR/8/34 generados para usar en este estudio

Virus recombinante			Posición del aminoácido en HA1									
Nombre completo		Abreviación*	36	83	86	120	155	156	189	212	223	263
A/HK/213/03 ΔH5N1 x PR/8/34		ΔH5N1/03	T	A	A	N	N	A	R	K	N	A
A/Vietnam/1203/04 ΔH5N1 x PR/8/34		ΔH5N1/04	K	T	V	S	S	T	K	R	S	T
A/Vietnam/1203/04 ΔH5 x PR/8/34		ΔH5/04	K	T	V	S	S	T	K	R	S	T
A/Vietnam/1203/04 ΔH5 _{S155-N} , T156-A x PR/8/34		ΔH5 _{S155-N} , T156-A/04	T	A	V	S	N	A	K	R	S	T
A/Vietnam/1203/04 ΔH5 _{S120-N} x PR/8/34		ΔH5 _{S120-N} /04	T	A	V	N	S	T	K	R	S	T
A/Vietnam/1203/04 ΔH5 _{R212-K} x PR/8/34		ΔH5 _{R212-K} /04	T	A	V	S	S	T	K	K	S	T
A/Vietnam/1203/04 ΔH5 _{S223-N} x PR/8/34		ΔH5 _{S223-N} /04	T	A	A	S	S	T	K	R	N	A
A/Vietnam/1203/04 ΔH5 _{S120-N} , S155-N, T156-A x PR/8/34		ΔH5 _{S120-N} , S155-N, T156-A/04	T	A	A	N	N	A	K	R	S	A
A/HK/213/03 ΔH5 _{N223-S} x PR/8/34		ΔH5 _{N223-S} /03	T	A	A	N	N	A	R	K	S	A
A/duck/Singapore/3/97 H5 x PR/8/34		H5/97 [†]	T	D	V	S	N	A	K	E	S	A
A/duck/Singapore/3/97 H5 _{S223-N} x PR/8/34		H5 _{S223-N} /97	T	D	V	S	N	A	K	E	N	A

*: Aminoácido multibásico Δ en el H5 fue removido por ingeniería genética

†: El tipo silvestre del A/DUCK/SINGAPORE/3/97 no tiene aminoácidos multibásicos

143

Tabla 1b. Diferencias en las secuencias de la proteína HA1 de los virus de la gripa H5N1

Virus	Posición del aminoácido en HA1									
	36	83	86	120	155	156	189	212	223	263
A/HK/213/03	T	A	A	N	N	A	R	K	N	A
A/Vietnam/1203/04	K	T	V	S	S	T	K	R	S	T
A/Vietnam/3046/04	T	A	V	S	S	T	K	R	S	T
A/Vietnam/3062/04	T	A	V	S	S	T	K	R	S	T
A/chicken/Vietnam/39/04	T	A	V	S	S	T	K	R	S	T
A/falcon/HK-D0028/04	T	A	A	S	S	A	K	K	S	A
A/duck/Singapore/3/97	T	D	V	S	N	A	K	E	S	A
A/HK/156/97	T	A	A	S	S	A	K	E	S	T

#251

Tabla 2. Análisis HI del virus recombinante ΔH5 con anticuerpos monoclonales anti H5

Virus	Anticuerpos monoclonales a H5 (títulos de HI)						
	VN04-6*	HK03-3†	CP24†	CP46†	CP58†	406/7†	
ΔH5N1/03	51200	6400	1600	100	1600	800	
ΔH5/04	12800	<100	800	<100	1600	<100	
ΔH5 s155-N, r156-A/04	3200	<100	800	<100	800	100	
ΔH5 s120-N/04	12800	200	800	<100	1600	<100	
ΔH5 r212-K/04	12800	100	1600	<100	6400	<100	
ΔH5 s223-N/04	51200	3200	12800	<100	25600	<100	
ΔH5 s120-N, s155-N, r156-A/04	12800	1600	3200	<100	1600	200	
ΔH5 N223-S/03	12800	800	≤100	<100	200	≤100	

Los análisis de HI fueron efectuados en placas de microtitulado con 0.5% de RBC (Glóbulos rojos) de pollo.

5 Los títulos son los recíprocos de las soluciones mínimas de mAb que inhiben la hemaglutina causada por 4 unidades hemaglutinantes (HAU) del virus.

*anti HA mAb al virus A/Vietnam/1203/03

† anti HA mAb al virus A/HK/213/03

†anti HA mAb al virus A/chicken/Pennsylvania/1370/83

117
145

Tabla 3. Immunogenicidad de los virus recombinantes A/Vietnam/1203/04 ΔH5 HA en hurones

Virus	Título de HI de sueros después de la inmunización con:											
	ΔH5/04			ΔH5 _{S155-N,T156-A} /04			ΔH5 _{S120-N} /04			ΔH5 _{S223-N} /04		
ΔH5N1/03	20	20	10	160	80	160	20	20	10	20	10	10
ΔH5/04	<u>20</u>	<u>20</u>	<u>20</u>	20	20	20	20	20	20	20	20	20
ΔH5 _{S155-N,T156-A} /04				<u>20</u>	<u>10</u>	<u>20</u>						
ΔH5 _{S120-N} /04							<u>80</u>	<u>80</u>	<u>20</u>			
ΔH5 _{S223-N} /04	160	320	320	160	320	160	320	320	320	<u>640</u>	<u>640</u>	<u>640</u>

Hurones de once semanas, seronegativos a la influenza, fueron vacunados dos veces a intervalos de 3 semanas con inyección intramuscular de una preparación de virus inactivado, purificado y concentrado conteniendo 7 µg HA en 250 µg de PBS. Los datos son títulos HI de 3 hurones presentados individualmente. El Análisis HI usó 0.5% de RBC de pollo.

24/11/11

Tabla 4. Títulos de neutralización de virus en suero de hurón después de vacunado con virus que contienen el HA modificado del virus A/Vietnam/1230/04.

	Títulos de anticuerpos neutralizados después de inmunización con:												
	ΔH5N1/04			ΔH5/04			ΔH5 _{S155-N} , T156-A/04			ΔH5 _{S223-N} /04			falso
ΔH5N1/03	1280	1280	320	640	320	640	1280	1280	320	640	640	640	<80
ΔH5N1/04	<u>2560</u>	<u>1280</u>	<u>640</u>	1280	640	640	1280	1280	640	640	1280	1280	<80
ΔH5/04	1280	1280	640	<u>1280</u>	<u>640</u>	<u>640</u>	1280	1280	640	640	1280	1280	<80
ΔH5 _{S155-N} , T156-A/04	1280	1280	640	1280	640	640	<u>1280</u>	<u>1280</u>	<u>640</u>	1280	1280	1280	<80
ΔH5 _{S223-N} /04	1280	1280	1280	1280	1280	640	1280	1280	320	<u>1280</u>	<u>1280</u>	<u>1280</u>	<80
ΔH5 _{S223-N} N1/04	1280	1280	640	1280	640	640	1280	1280	640	1280	1280	1280	<80

El ensayo de neutralización fue ejecutado en celdas MDCK. Los títulos son los recíprocos de las soluciones mínimas de suero que inhibieron completamente 100 TCID₅₀ del virus. Los títulos homólogos están subrayados. Los valores son títulos de neutralización de 3 hurones presentados individualmente.

5th
5th

Tabla 5. Análisis HI de antisueros de 2003 H5N1 contra virus mutantes

Antisuero policlonal a:		
Virus	Vacuna del A/H5N1/03	A/HK/213/03 (H5N1)
A/H5N1/03	2560	2560
A/H5/04	160	160
A/H5 _{S155-N, T156-A}	80	320
A/H5 _{S120-N/04}	320	320
A/H5 _{S223-N/04}	1280	640

5 El análisis HI fue ejecutado en placas de microtitulado con 0.5% de glóbulos rojos (RBC) de pollo (Palmer et al. In US Department of Health, Educational and Welfare, Immunology series no. 6. Atlanta: Centers for disease Control and Prevention, 1975). Los títulos son los recíprocos de la soluciones mínimas de sueros que inhiben la hemaglutinina causada por 4 unidades de HA del virus.

81
28

Tabla 6. Análisis antigénico de los virus H5/97 y ΔH5_{5223-N}/97 con anticuerpos policlonales y monoclonales

Virus	Titulo HI de antisueros policlonales:						Titulo HI de mAb:					
	A/cK/Hid	A/HK/15	A/Gs/HK	A/cK/HK/	A/HK/21	ΔH5/03	VN04-6*	HK03-3 [†]	CP58 [†]	CP24 [†]	CP46 [†]	CP406/7 [†]
	Algo/94	6/97	/497-4/97	YU22/02	3/03							
ΔH5/03	20	320	512C	12800	160	5120	25600	6400	1600	12800	<100	1600
H5/97	40	640	640	320	<10	10	3200	<100	3200	1600	<100	3200
H5 _{5223-N} /97	320	10240	10240	2560	80	1280	25600	<100	25600	51200	200	25600

* anti HA mAb al virus A/Vietnam/1230/04

5 † anti HA mAb al virus A/HK/213/03

† anti HA mAb al virus A/Chicken/Pennsylvania/1370/83

El análisis HI se efectuó en placas de microtitulado con 0.5% de RBC de pollo (14). Los títulos son los recíprocos de las soluciones mínimas de suero que inhiben la hemaglutina causada por 4 unidades de HA del virus.

149

[108] El invento presente no es para ser limitado en el campo de acción por las incorporaciones específicas descritas dentro de este documento. En Verdad, varias modificaciones del invento en adición a aquellas descritas dentro de este documento llegarán a ser aparentes para aquellos con experiencia en el oficio a partir de las anteriores descripciones y de las figuras acompañantes. Tales modificaciones se intentan para que caigan dentro del campo de acción de las reivindicaciones anexadas.

10 [109] Es, además para ser entendido, que todos los valores son aproximados y se suministran para descripción.

[110] Todas las patentes y aplicaciones de patentes citadas en este documento están por este medio incorporadas enteramente dentro del documento.

122
150

Lo que se reivindica es:

1. Una molécula de hemaglutinina (HA) del virus de influenza que contiene una sustitución de un aminoácido en el sitio de fijación en el receptor que hace a la molécula de HA más antigénica respecto a anticuerpos específicos que la molécula carente de sustitución del aminoácido en el sitio de fijación de su receptor.
2. La molécula de HA del virus de influenza de la reivindicación 1 que consta del aminoácido asparagina en la posición correspondiente a la posición 223 en la HA del H5, en donde la inclusión de asparagina tiene como resultado una reactividad incrementada con los antisueros obtenidos de un animal expuesto a un virus de influenza con una molécula HA del tipo silvestre.
3. La molécula HA del virus de influenza de la reivindicación 1 que contiene el aminoácido asparagina en la posición correspondiente a la posición 223 en la HA del H5, en donde la molécula de HA no se origina con H5 del aislado humano del A/HK/213/03 y la inclusión de asparagina en la posición 223 tiene como resultado una reactividad incrementada con antisueros obtenidos de un animal expuesto a un virus de influenza.
4. La molécula HA del virus de influenza de la reivindicación 1, en donde la sustitución del aminoácido altera un sitio de glicosilación.
5. La molécula HA del virus de influenza de la reivindicación 1, en donde el virus de influenza es un virus de influenza A humana.

23
151

6. La molécula HA del virus de influenza de la reivindicación 5, en donde el virus de influenza A humana es un miembro del subtipo H5.
7. La molécula HA del virus de influenza de la reivindicación 5, en donde el virus de influenza A humana es un virus A/Vietnam/1203/04 (H5N1).
8. La molécula HA del virus de influenza de la reivindicación 1, en donde el virus de influenza humana es un virus de influenza B.
9. La molécula HA del virus de influenza de la reivindicación 1 la cual es derivada de un virus de influenza aviar.
10. Un virus recombinante de influenza que contiene la molécula HA del virus de influenza de la reivindicación 1.
11. Un sistema de genética inversa para hacer un virus que contiene la molécula HA del virus de influenza de la reivindicación 1.
12. El virus recombinante de influenza de la reivindicación 10, en donde la molécula de HA del virus de influenza se obtiene del virus de influenza H5N1 en el antecedente genético de un virus de influenza A.
13. El virus recombinante de influenza de la reivindicación 12, en donde el virus de influenza A es un virus de cepa maestra
14. El virus recombinante de influenza de la reivindicación 10, en donde el virus es usado como virus de referencia para diagnóstico en un ensayo de inhibición de hemaglutinina (HI).
15. Un conjunto para ensayos de inhibición de hemaglutinina (HI) que incluye el virus recombinante de influenza de la reivindicación 10.

24
52

16. Un método para hacer un virus que incluye la molécula de HA de la reivindicación 1, método que incluye la introducción de un vector recombinante que expresa la molécula HA del virus de influenza de la reivindicación 1 en un sistema de genética inversa.
17. Un método para determinar la eficacia de una vacuna del virus de influenza en un animal, método el cual incluye un antisuero reactivo obtenido de un animal vacunado con una molécula de hemaglutinina (HA) del virus de influenza que contiene una o más sustituciones de aminoácidos en el sitio de fijación del receptor que hace a la molécula de HA más antigénica con relación a anticuerpos específicos que la molécula de HA carente de la sustitución del aminoácido en el sitio de fijación del receptor que está presente en la vacuna del virus de influenza.
18. El método de la reivindicación 17, en donde la molécula de HA se origina con H5N1 de aislado humano del A/HK/223/03 y la inclusión de asparagina en la posición que corresponde a la posición 223 en la HA del virus H5N1 tienen como resultado una reactividad incrementada con antisueros obtenidos del animal vacunado.
19. Un método para producir un virus de influenza que contiene una molécula de hemaglutinina (HA), método que incluye el cultivo en un sistema de genética inversa en el cual el ADN que codifica el HA codifica una o más sustituciones de aminoácido en el sitio de fijación del receptor que hacen a la molécula de HA más antigénica respecto a anticuerpos específicos que la molécula de HA carente de la sustitución del aminoácido en el sitio de fijación del receptor por el proceso de genética inversa.

125
153

20. Un método que incrementa la sensibilidad de un ensayo de inhibición de hemaglutinina (HI), método el cual incluye antisueros reactivos obtenidos de animales vacunados o infectados con una molécula de hemaglutinina (HA) del virus de influenza que incluye una o varias sustituciones de aminoácidos en el sitio de fijación del receptor que hace a la molécula de HA más antigénica respecto a anticuerpos específicos que la molécula de HA carente de la sustitución de aminoácido en el sitio de fijación del receptor.
21. El método de la reivindicación 20, el cual resulta, por lo menos, en un incremento que duplica la sensibilidad de un ensayo de inhibición de hemaglutinina (HI).
22. El método de la reivindicación 20, el cual resulta, por lo menos, en un incremento que cuadruplica la sensibilidad de un ensayo de inhibición de hemaglutinina (HI).
23. Un método que determina cuando ha sido expuesto un animal a un virus de influenza, método que incluye la reacción de antisueros, obtenidos del animal, con virus de referencia para diagnóstico, el cual es obtenido del virus de influenza en cuestión pero que incluye una molécula de hemaglutinina (HA) de virus de influenza que contiene una o más sustituciones de aminoácido en el sitio de fijación del receptor que hace a la molécula de HA más antigénica respecto a anticuerpos específicos que la molécula de HA carente de sustituciones de aminoácido en el sitio de fijación de su receptor que resulta en una reactividad incrementada con los antisueros.
24. Un método que determina cuando ha sido expuesto un animal a un virus de influenza, método el cual incluye la reacción de antisueros, obtenidos del animal, con virus de

126
154

referencia para diagnóstico , el cual es obtenido del virus de influenza en cuestión pero que incluye una molécula de HA del virus de influenza que contiene el aminoácido asparagina en la posición correspondiente a la posición 223 de la HA del H5, en donde la inclusión de la asparagina resulta en una reactividad incrementada con antisueros obtenidos de un animal expuesto a un virus de influenza con la molécula HA del tipo silvestre que resulta en una reactividad incrementada con los antisueros.

10 25. Un método que determina cuando ha sido expuesto un animal a un virus de influenza, método que incluye la reacción de antisueros, obtenidos del animal, con virus de referencia para diagnóstico, el cual es obtenido del virus de influenza en cuestión pero que incluye una molécula de HA del virus de la reivindicación 1, que contiene el aminoácido asparagina en la posición correspondiente a la posición 223 en la HA del H5, en donde la molécula de HA no se origina con H5 del aislado humano del A/HK/213/03 y la inclusión de la asparagina en la posición 223 resulta en una reactividad incrementada con antisueros obtenidos de un animal expuesto a un virus de influenza.

26. El método de cualquiera de las reivindicaciones 17, 18, 23, 24 o 25, en donde el animal es un hurón.

27. El método de cualquiera de las reivindicaciones 17, 18, 23, 24 o 25, en donde el animal es un humano.

28. Un virus para vacuna de influenza que contiene una molécula de hemaglutinina (HA) que contiene una sustitución de aminoácido en el sitio de fijación del receptor que hace a la molécula de HA más antigénica respecto a anticuerpos específicos que la molécula de HA carente de sustitución

177
155

del aminoácido en el sitio de fijación del receptor y en donde la modificación resulta en una inmunogenicidad incrementada de dicho virus para vacuna.

29. Un ácido nucleico aislado que codifica la molécula de HA
5 del virus de influenza de la reivindicación 1.

30. Un ácido nucleico aislado que codifica la molécula de HA del virus de influenza de la reivindicación 3.

31. Un método para preparar el ácido nucleico de la reivindicación 29, método que comprende la introducción de
10 una secuencia del nucleótido dentro de un ácido nucleico que codifica la molécula de HA carente de la sustitución del aminoácido en el sitio de fijación del receptor, que resulta en una sustitución del aminoácido en la secuencia de la molécula de HA que hace a la molécula mas antigénica
15 respecto a anticuerpos específicos que la molécula carente de la sustitución del aminoácido.

32. El método de la reivindicación 23, en donde la molécula de HA contiene una asparagina en la posición que corresponde a la posición 223 en la HA del H5.

20 33. El método de la reivindicación 28, en donde el virus para vacuna de influenza contiene una molécula de HA que incluye un aminoácido asparagina en la posición correspondiente a la posición 223 en la HA del H5.

34. Una molécula de HA del virus de influenza de cualquiera
25 de las reivindicaciones 1 a 9 para uso como medicamento en el tratamiento o la prevención de una infección por virus de influenza.

35. El uso de una molécula de HA del virus de influenza de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en la fabricación

178
156

de un medicamento para el tratamiento de una infección por virus de influenza.

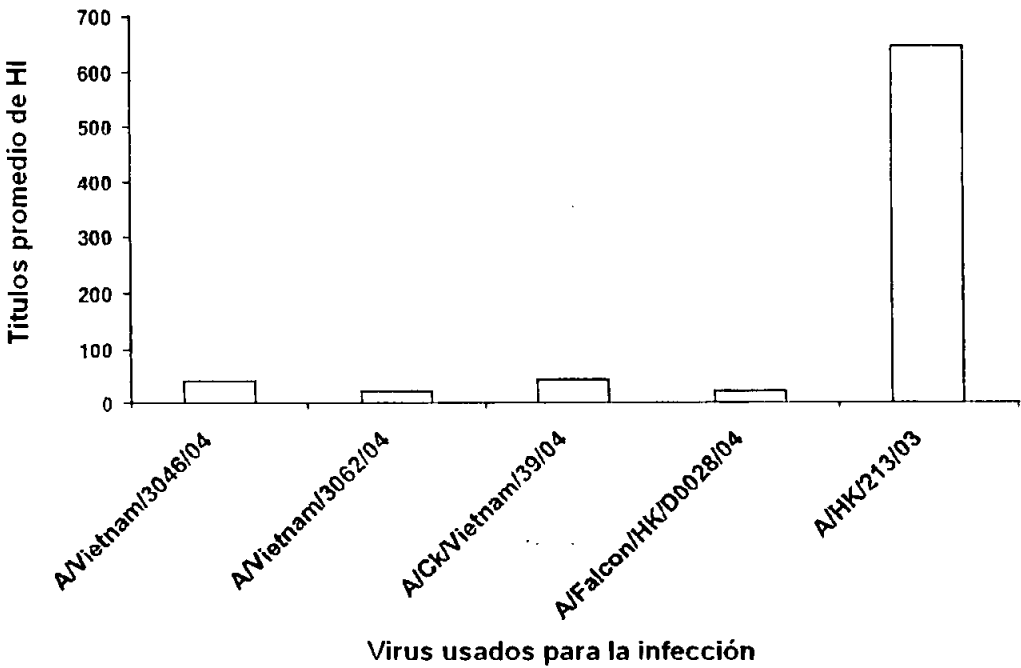
36. Un virus recombinante de influenza que contiene la molécula de HA del virus de influenza de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para uso como un medicamento en el
5 tratamiento o prevención de una infección por virus de influenza.

37. El uso de un virus recombinante de influenza que contiene la molécula de HA del virus de influenza de cualquiera de
10 las reivindicaciones 1 a 9 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una infección por virus de influenza.

129
757

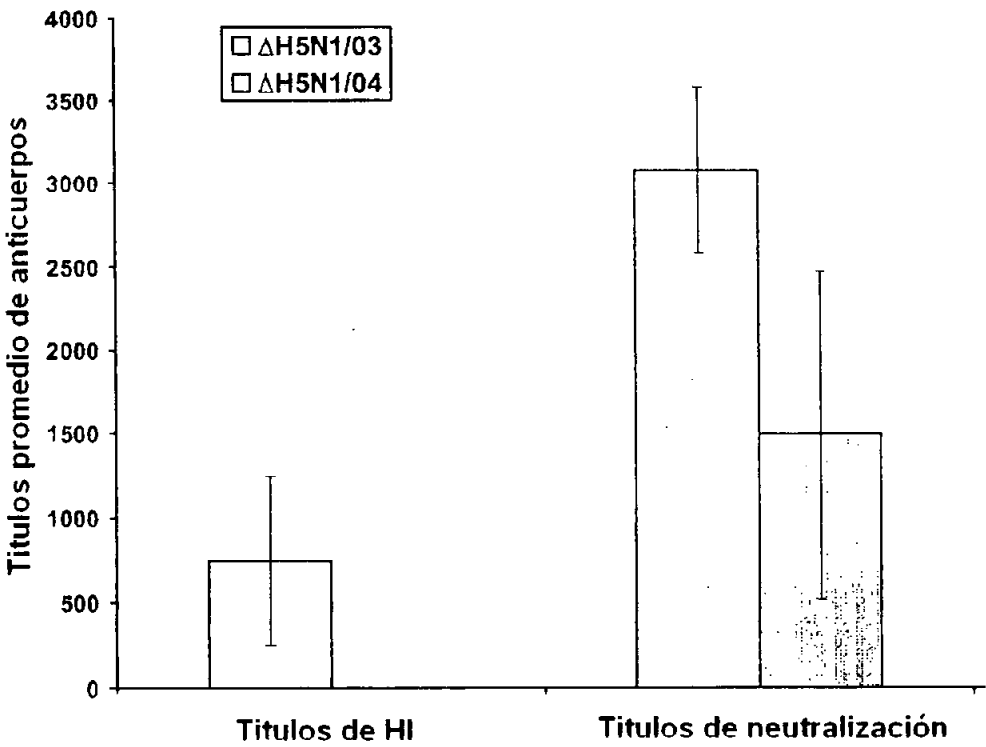
Figura 1.

A



20

B



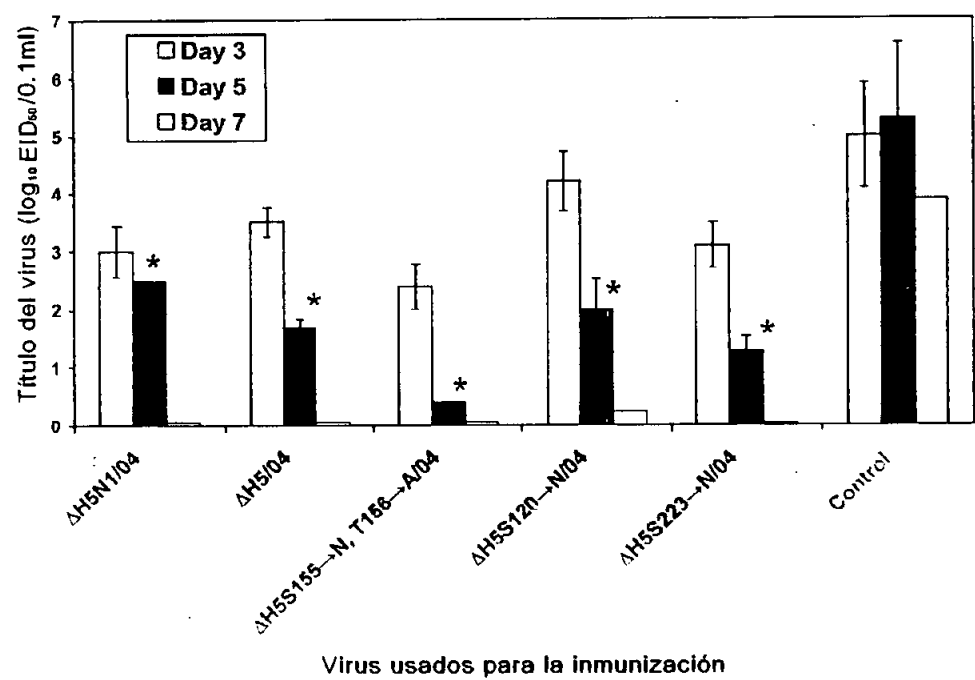
120
158

5

10

2/3

Figura 2.

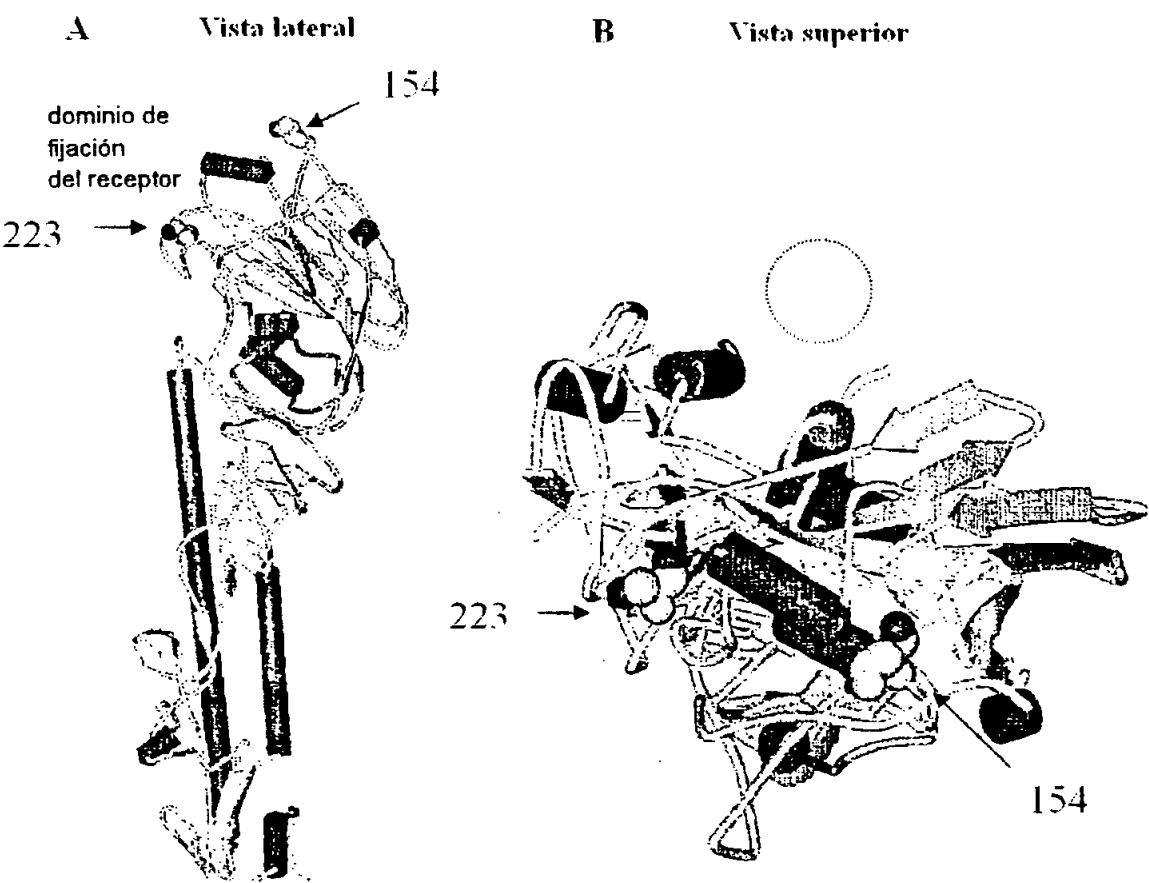


131
159

5

3/3

Figura 3.



10

15

137
160

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 2203094-W00	FOR FURTHER ACTION	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
International application No. PCT/US 06/29575	International filing date (day/month/year) 28 July 2006 (28.07.2006)	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 04 August 2005 (04.08.2005)
Applicant St. Jude Children's Research Hospital		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 2 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (see Box No. II)

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box No. III)

4. With regard to the title,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____
☐ as suggested by the applicant
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract

133
161

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 06/29575

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8): C12N 15/86, 5/06, 5/16 (2007.01)
USPC: 435/456

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
USPC: 435/5, 235.1, 339, 948

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Virology 334, 2005, 276-283, PNAS 1983, 80, 6996-7000, J. Virology, Feb. 2005, p. 21912198, PNAS 2000, 97, 6108-6113

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WEST: (USPT, JPAB, EPAB) hemagglutinin, HA
Google Scholar and Patent: viral, protein, HA, hemagglutinin, vaccine, diagnostic kit, hemagglutinin inhibition, antigenicity, H5N1, receptor, A/HK/213/03

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Both et al. Hemagglutinin of Swine Influenza Virus: A Single Amino Acid Change Pleiotropically Affects Viral Antigenicity and Replication. PNAS. November 1983, V80, p6996-7000, p. 7000 col 1 para 5 ln 1-5, p. 7000 col 2 ln 7-10, Table 2	1, 8, 20-22 2-7, 9-19, 23-37
Y	Gambaryana et al. Receptor specificity of Influenza viruses from birds and mammals: New data on involvement of the inner fragments of the carbohydrate chain. Virology, February 2005, V334, p276-283, abstract, p. 280 col 2 ln 10-18, p. 227 col 2 ln 22-27	2-7, 9, 26-27, 29-31, 33-37
Y	Hoffman et al. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. PNAS. May 2000, V97, p6108-6113, p. 6108 col 2, p. 6109 col 1 ln 1-10, p. 6112 ln 9-11, p. 6111 col 1 ln 7-10 and 6113 col 1 ln 1-4, p. 6996, p. 6109 col 1 ln 3, Figure 1, Figure 2	10-18, 19, 29-31
Y	US 6,719,979 B2 (Peeters, et al.) 13 April 2004 (13.04.2004), col 14 ln 46-52, col 14 ln 58-60, col 9 ln 19-21	15, 17-18, 23-28, 32-33
Y	Govorkova et al. Lethality to Ferrets of H5N1 Influenza Viruses Isolated from Humans and Poultry in 2004. J. Virology, February 2005, V79(4), p. 2191-2198, p. 2192 results ln 19-20, and abstract	7, 26-27
Y	US 6,740,325 B1 (Amon, et al.) 25 May 2004 (25.05.2004) col 3 ln 24 26	34-37

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 March 2007 (22.03.2007)

Date of mailing of the international search report

21 MAY 2007

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

17. Un método para determinar la eficacia de una vacuna del virus de influenza en un animal, método el cual incluye un antisuero reactivo obtenido de un animal vacunado con una molécula de hemaglutinina (HA) del virus de influenza que contiene una o más sustituciones de aminoácidos en el sitio de fijación del receptor que hace a la molécula de HA más antigénica con relación a anticuerpos específicos que la molécula de HA carente de la sustitución del aminoácido en el sitio de fijación del receptor que está presente en la vacuna del virus de influenza.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 11,299
FECHA : FEBRERO 11 DE 2008

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-023024- -00000-0000

Fecha: 2008-03-04 16:34:37 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 163

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	2678193	11/02/2008	51,814,500.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501,000.00
		TOTAL :	\$ 501,000.00

SON: QUINIENTOS UN MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Colo 16331-8 91001-2



No. 08-023024- -00000-0000

Fecha: 2008-03-04 16:34:37 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTE IYI Eve: 378 FASE NACIONAL I
Act. 411 PRESENTACION Folios: 163

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE

PCT

PATENTE DE INVENCION []

MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de 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 []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de 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 []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Firma Responsable

Fecha

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

165

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Folio 165

2020
Bogotá D.C.,

Doctor(a)
FERRERO EMILIO
Apoderado(a) y/o Representante de
ST. JUDE CHILDRENS RESEARCH HOSPITAL

REFERENCIA	Radicación No.	8 23024
	Solicitud internacional	PCT/US2006/029575
	Fecha inicio fase nacional	04/03/2008
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	416
	Oficio No.	5818
	Folios	1

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Cúmplase
Dado en Bogotá DC,

08 ABR. 2008

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

jfernand