

As. 118.339

Señor

**DIRECTOR DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**

E. S. D.

REF: Expediente No. **11. 144.904** solicitud de patente de invención a favor de
ACADEMIA SINICA Título: **METHODS AND COMPOSITIONS FOR
IMMUNIZATION AGAINST VIRUS**

RESPUESTA A EXAMEN DE FONDO

JUAN PABLO CADENA SARMIENTO, portador de la tarjeta profesional No. 57.492 del C.S.J., obrando como apoderado de la sociedad solicitante me permito dar respuesta al Oficio No. 8273 relacionado con la patentabilidad de la presente invención y notificado por fijación en lista el 28 de Junio de 2016.

Tasa reivindicación adicional

Con la presentación inicial se cancelaron 76 reivindicaciones adicionales, las cuales cubren las 26 adicionales ahora presentadas.

Excepción patentabilidad

Las reivindicaciones 35-37 han sido eliminadas de acuerdo a la sugerencia de su despacho.

Claridad

Presento a consideración de su despacho un nuevo pliego reivindicatorio en donde se han realizado modificaciones sustanciales al mismo.

Descripción

Antes de argumentar respecto a la objeción de la descripción, deseamos enfatizar que la invención ha sido restringida a una composición inmunogenica que comprende glicoproteínas del virus de la gripe parcialmente glicosiladas que contienen un glicano de uno, dos o tres residuos de azúcar. Teniendo en cuenta este nuevo alcance, es claro que una persona versada en la materia en vista de

las enseñanzas de la descripción habría comprendido claramente que los antígenos virales del tipo **mono, di y tri glicosilados** tienden a tener una inmunogenicidad mucho mayor en comparación con las glicoproteínas virales glicosiladas, lo que, evidentemente, es un excelente punto de partida para el desarrollo y obtención de composiciones inmunogenas y vacunas para el tratamiento de la gripe. Ahora bien, tal como se desprende de la descripción, las glicoproteínas mono, di o tri- glicosiladas, presenta una mayor inmunogenicidad al tener muchos más sitios de glicosilación expuestos; por lo tanto, al haber muchos más sitios de glicosilación expuestos, los mismos se convierten en excelentes epitopos antigénicos para la inducción de respuestas inmunes. Estas propiedades se encuentran ampliamente discutidas en la descripción tal como se puede observar en los siguientes extractos:

*Las glucoproteínas de superficie celular de virus constituyen dianas excelentes para el desarrollo de vacunas. No obstante, tales proteínas de superficie son a menudo altamente glucosiladas por el anfitrión para proteger el virus del sistema inmunitario del anfitrión. Adicionalmente, las secuencias proteínicas víricas alrededor de los sitios de glucosilación están a menudo altamente conservadas y, por consiguiente, son un **excelente antígeno** para el diseño de vacunas; no obstante, estas regiones altamente conservadas no se encuentran fácilmente disponibles al sistema inmunitario del anfitrión por lo menos en parte, debido a la cantidad de **glucosilación que cubre o bloquea esas regiones**. (énfasis añadido)*

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

En vista de lo anterior, la composición de la presente invención están basadas en el concepto de que las glicoproteínas de superficie virales como la proteína hemaglutinina del virus de la gripe (HA) las cuales presentan uno, dos o tres sitios de glicosilación tienden a presentar una mayor habilidad para inducir respuestas inmunes en contra de virus en comparación a los antígenos completamente glicosilados. Esto se debe principalmente a que existe una mayor exposición de la proteína y por lo tanto los sitios de unión al epítipo se incrementa de forma considerable aumentando es esta forma la inmunogenicidad de la composición de la invención.

Ahora bien, para entender aún más el concepto anterior, hacemos referencia al **anexo A** en donde se ilustra de manera mucho más clara la estructura proteica de la proteína HA completamente glicosilada en comparación con los antígenos HA mono, di y tri- glicosilados. En dichas figuras se observa claramente que muchas regiones del antígeno HA se encuentran completamente glicosiladas (Fig. D), mientras que en los casos A-C en donde los glicanos contienen uno, dos o tres unidades de azúcar, dichas regiones se encuentran mucho más expuestas. Una vez más, una persona versada en la materia puede comprender claramente el alcance de la presente invención en el sentido que los antígenos virales del tipo mono, di o tri-glicosilados presentan una mayor exposición de epítopos lo que repercute directamente en la inmunogenicidad de la composición.

En vista del concepto anteriormente descrito, un versado en la materia se encuentra en plena capacidad de desarrollar y obtener la composición reivindicada por lo que damos por superada la objeción de su despacho en tal sentido.

Por otra parte, discrepamos enormemente en cuanto a la objeción de su despacho según la cual la presente invención no presenta pruebas técnicas que demuestren la actividad inmunogenica de la invención ya que la descripción si sustenta de manera amplia la actividad inmunogenica de la presente invención tal como exponemos a continuación.

Contrario a la anterior afirmación, la presente invención si revela datos experimentales que sustentan el concepto inventivo de la presente invención. Por ejemplo, llamamos la atención de su despacho a las **figuras 5A-5D, Figura 12, 13 y figuras 15-18** en donde se evidencias los efectos sorprendentes de la presente invención. De manera específica invitamos a su despacho a leer la información relativa el ejemplo 12, que según la descripción de la invención establece lo siguiente:

*“[0058] Fig. 12 muestra la capacidad de los antisueros generados de HA H5 completamente glucosilada, alta manosa y monoglucosilada, de inhibir la transducción del virus pseudotipado Vietnam 1203 HA en células HEK293. **Los dos antisueros HA alta manosa y monoglucosilada inhiben la entrada del virus, pero los antisueros HA completamente glucosilada no la inhiben**”. (énfasis fuera de texto)*

De acuerdo a lo anterior, se evidencia claramente que la proteína monoglicosilada de acuerdo al alcance de la presente invención si inhibió la entrada del virus contrario a su par completamente glicosilado en donde no hubo inhibición del virus. Este resultado es evidente, ya que, como se dijo previamente, a menor glicosilación de la proteína, la superficie expuesta es mayor, dando lugar a la presencia elevada de epitopos que puedan interactuar con el anticuerpo. Adicionalmente, con la presente respuesta, adjuntamos datos adicionales (**anexo B**) que demuestran que los antígenos HA tri y monoglicosilados presentan una inmunogenicidad similar entre ellos pero mucho mayor en comparación a la inmunogenicidad observada por el antígeno que se encuentra completamente glicosilado.

En conclusión, la presente invención si cumple con los lineamientos del artículo 28 de la Decisión 486 y que un versado en la materia tiene la mano toda la información necesaria para su ejecución.

En cuanto a la claridad de la invención, consideramos que el nuevo pliego reivindicatorio cumple con todos y cada una de los lineamientos del artículo 30 de la Decisión 486. Sin embargo, consideramos pertinente realizar las siguientes aclaraciones:

La nueva reivindicación 1 contiene todas y cada una de las características esenciales de la invención que permiten solucionar el problema técnico planteado. Específicamente, la glicoproteína que comprende el glicano en donde el glicano consiste de uno, dos o tres residuos de azúcar, es la principal característica de la invención y es dicha característica la que permite que la invención “funcione” y solucione el problema técnico según lo argumentado previamente. En la presente invención, ni las proporciones ni los excipientes son esenciales en la solución al problema técnico y por lo tanto no vemos cual es la base legal o técnica para exigir su incorporación dentro de la reivindicación principal. Nuevamente, hacemos énfasis en que el concepto inventivo de la invención recae sobre la glicoproteína glucosilada mas no en la presencia de X o Y excipiente o proporción alguna. En otras palabras, ni los excipientes ni las proporciones son esenciales para solucionar el problema técnico planteado. La

actividad inmunogenica de la invención no recae sobre ningún excipiente en particular. Si así fuera, el solicitante habría incluido con total seguridad el o los excipientes dentro de la reivindicación principal.

Tal como se desprende de la descripción, el problema técnico objetivo es el de proporcionar una composición inmunogenica mejorada con el fin de proporcionar protección en contra del virus de la influenza. Dicho problema técnico se soluciona mediante la glicoproteína parcialmente glicosilada de la invención, en donde dicha proteína es mono, di o tri-glicosilada. Por lo tanto, inmunogenicidad mejorada de la invención está dada por dicha glicoproteína glicosilada más no por un determinado excipiente o proporcione en particular. Los excipientes descritos en las reivindicaciones dependientes son totalmente ajenos a la actividad de la composición ya que los mismos son totalmente inactivos en el aumento de la inmunogenicidad. Nuevamente, no vemos ninguna base legal o técnica para incluir los excipientes y/o las proporciones en la composición ya que estos no tienen nada que ver con el aumento de la inmunogenicidad que si se busca con la glicoproteína glicosilada reivindicada en la reivindicación principal.

En cuanto al termino parcialmente glicosilado, realmente no comprendemos el alcance de dicha objeción y más aún cuando la misma reivindicación establece que el glicano de la glicoproteína contiene **uno, dos o tres residuos de azúcar lo que evidentemente restringe el alcance reivindicado.** Consideramos entonces que es absolutamente claro el alcance de la invención en vista de dicha restricción y es la justa compensación que debería darse al solicitante en virtud de la información revelada al público en la descripción.

Argumenta su despacho que los términos sitio de O-glicosilacion y N-glicosilacion son ambiguos. Al respecto deseamos enfatizar que dichos términos son ampliamente utilizados en el campo técnico de la invención y que los mismos no generan ningún tipo de confusión entre las personas que manejan este lenguaje en el campo técnico ya que dicha terminología se emplea para definir los 2 tipos de glicosilacion presentes en las proteínas. Para mayor claridad de su despacho, estamos adjuntando con esta repuesta un esquema en donde se observa de forma detallada los 2 tipos de glicosilacion presentes en las proteínas. En el caso de la N-glicosilacion, la unión se hace entre la N-acetilglucosamina y el aa asparaginina mientras que en la O-glicosilacion, dicho enlace ocurre entre la N-acetilglucosamina y el aa serina o treonina.

Su despacho también establece que la reivindicación 41 no es clara porque menciona de manera general “métodos químicos o enzimáticos” los cuales no se encuentran soportados en la descripción (...).

Al respecto deseamos aclarar que los ejemplos de la descripción son únicamente con carácter **ilustrativo** más no **limitativo** de la materia reivindicada. Se entiende que la descripción de una invención debe revelar toda aquella información que permite a un versado en la materia junto con **sus conocimientos** ejecutar o llevar a la práctica la invención. En el presente caso, si bien la descripción establece que la glicoproteína se puede generar mediante de-glicosilación parcial usando métodos químicos o enzimáticos, la ejecución de dichos métodos es ampliamente conocida por un versado en la materia. De hecho, en el documento D3 citado por su despacho, se discuten de una manera muy amplia algunas técnicas para la remoción de azúcares por lo que dichas técnicas se encontraban ya disponibles para el versado en la materia antes de la concepción de la presente invención.

En vista de las anteriores aclaraciones, solicitamos a su despacho dar por superadas todas y cada una de las objeciones de claridad emitidas en contra de la presente invención.

Pasando a la novedad de la invención de las antiguas reivindicaciones 40-44, 46 y 49 correspondientes a las nuevas reivindicaciones **27-36**, es nuestro deseo presentar los siguientes argumentos.

Contrario a las enseñanzas de la presente invención, el documento D2 no revela en ninguna parte de sus enseñanzas la etapa en donde se remueve al menos una porción de un glicano a partir de una proteína viral con el fin de producir un glicano que comprende uno, dos o tres residuos de azúcar. Por esta razón, al no encontrarse dicha característica en el arte previo D2, la presente invención en sus reivindicaciones 27-36 cumple con el requisito de novedad.

Por otra parte, su despacho argumenta que la reivindicación 1 no cumple con el requisito de nivel inventivo en vista de las enseñanzas de los documentos D1 y D2.

Teniendo en cuenta el alcance de la nueva reivindicación 1 en donde el glicano de la glicoproteína viral comprende **uno, dos o tres residuos de azúcares**, es claro que ninguna combinación de enseñanzas de los documentos D1 y D2 habría sido resultado suficiente para alcanzar el objeto de la presente invención ya que dichos documentos son **totalmente silenciosos** en cuanto a la característica arriba descrita. Teniendo en cuenta que la obviedad de una invención debe

juzgarse justamente en la combinación de enseñanzas del arte previo, es absolutamente claro que al no haber sugerencia alguna en los documentos D1 y D2 respecto al nivel de glicosilación de la glicoproteína, no había posibilidad alguna de llegar a la invención tal como se reivindica en la medida que dichos documentos D1 y D2 fallan en enseñar dicha característica tan esencial para la invención.

Ahora bien, con respecto a la referencia Munk et al., “*Carbohydrate masking of an antigenic epitope of influenza virus haemagglutinin independent of oligosaccharide size*,” *Glycobiology*, vol. 2, no. 3, pp. 233-240, 1992, (Munk) citada en el oficio técnico deseamos establecer lo siguiente:

Como primera medida, Munk enseña que el truncamiento enzimático de carbohidratos HA a un residuo sencillo de N-acetilglucosamina no permite la unión del anticuerpo a HA mientras que remoción completa del carbohidrato del antígeno HA sí permite la unión al anticuerpo. Adicionalmente, Munk revela que tan solo la presencia de un residuo de N-acetilglucosamina en asparaginina 149 es suficiente **para prevenir el reconocimiento del epítipo del péptido HA**. Por lo tanto, en vista de esta enseñanza específica, un versado en la materia en vista de Munk habría optado por **evitar** la glicosilación de la proteína ya que de hacer esto se habría disminuido la inmunogenicidad de la misma ya que dicha glicosilación **habría evitado el reconocimiento del epítipo del péptido HA**.

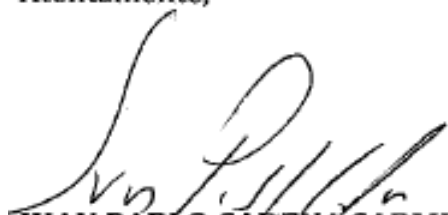
Por lo tanto, dadas las enseñanzas de Munk es posible concluir que dicho arte previo en realidad va **totalmente en contra** del concepto inventivo de la presente invención en la medida que Munk, de hecho, aleja al versado en la materia en cuanto a la utilización de **glicoproteínas monoglicosiladas** en composiciones inmunogénicas con el fin de elevar la respuesta inmune como sí lo hace la composición de la presente invención.

Mientras que Munk enseña que un residuo de N-acetilglucosamina en asparaginina 149 es suficiente **para prevenir el reconocimiento del epítipo del péptido HA**, la presente invención va claramente en **la dirección opuesta** al enseñar mono, di y tri glicosilaciones en la glicoproteína, las cuales son suficientes para **aumentar la inmunogenicidad** de la composición inmunogénica. Tal como se expuso al inicio del memorial, la glicoproteína de la invención presenta una mayor cantidad de sitios de glicosilación expuestos, y por lo tanto, un mayor número de sitios de unión a epítipo.

Finalmente, la reivindicación 45, nueva reivindicación 30 fue objetada por nivel inventivo. Al respecto, teniendo en cuenta que dicha reivindicación depende de la reivindicación 27 que es novedosa e inventiva, la misma también cumple con dichos requisitos en virtud de su dependencia.

En vista de lo anterior, es claro que la presente invención cumple con el requisito de nivel inventivo ya que (i) al arte previo es totalmente silencioso en cuanto a las características de la invención, (ii) el arte previo va en la dirección opuesta a la presente invención y (iii) adicionalmente, la invención presenta resultados experimentales que sustentan la actividad inmunogenica de la invención.

Atentamente,



JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

T.P. No. 57.492 del C.S.J.

C.C. 80.410.337 de Usaquén

Calle 70 A No. 4 - 41

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogenica que comprende:

una glicoproteína parcialmente glicosilada del virus de la gripe o un fragmento inmunológicamente activo de la misma, en donde la glicoproteína del virus de la gripe o el fragmento inmunológicamente activo comprende un glicano unido a un sitio de glicosilacion del mismo y en donde el glicano consiste de uno, dos o tres residuos de azúcar.

2. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la glicoproteína del virus de la gripe parcialmente glicosilada es una hemaglutinina del virus influenza (HA), una neuraminidasa (NA), o una proteína M2.

3. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la glicoproteína del virus de la influenza, es una hemaglutinina del virus de influenza.

4. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 3, en la que la hemaglutinina se deriva de una cepa de virus de la gripe seleccionada del grupo que consiste del virus de la influenza H1, H3, H5 y.

5. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 3, en la que la hemaglutinina comprende un polipéptido estacional H1 (Brisbane).

6. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el sitio de glicosilación es un sitio de O-glicosilación, o un sitio de N-glicosilación.

7. La composición inmunogénica según la reivindicación 1, en la que la glicoproteína del virus de la gripe es una glicoproteína de superficie viral de un virus de la gripe aviar, un virus de influenza animal, o un virus de la gripe humana.

8. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la glicoproteína del virus de la gripe es una glicoproteína de superficie viral de virus aviar de la gripe H5N1.
9. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el virus de la gripe es la influenza A.
10. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el glicano comprende una N-acetilglucosamina (GlcNAc), una manosa, o ambos.
11. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el glicano se compone de un resto de azúcar.
12. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 11, en la que el residuo de azúcar es la N-acetilglucosamina (GlcNAc).
13. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el glicano se compone de dos residuos de azúcar.
14. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la glicoproteína viral comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 10.
15. La composición inmunogénica según la reivindicación 14, en el que el sitio de glicosilación es el residuo asparagina en la posición 177 de la SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 10.
16. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la glicoproteína del virus de la gripe comprende un consenso de secuencia de aminoácidos H5 HA como se expone en SEQ ID NO: 4.
17. La composición inmunogénica según la reivindicación 16, en la que el sitio de glicosilación es el residuo de asparagina en las posiciones 39, 127, 170, 181, 302, 495 o 500 de la SEQ ID NO: 4.

18. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, en la que el glicano comprende un residuo de fucosa.
19. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además un adyuvante.
20. La composición inmunogénica según la reivindicación 19, en el que el adyuvante se selecciona del grupo que consiste en hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, tanto hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, adyuvante incompleto de Freund (IFA), escualeno, alumbre y MF59.
21. Una composición inmunogénica que comprende:

un polipéptido inmunogénico que comprende una glicoproteína de superficie viral, o un fragmento inmunológicamente activo del mismo, en el que la glicoproteína de superficie viral o un fragmento inmunológicamente activo de la misma comprende un glicano unido a un sitio de glicosilación del mismo, y en el que el glicano se compone de uno, dos o tres residuos de azúcar .
22. La composición inmunogénica según la reivindicación 21, que comprende además un adyuvante.
23. La composición inmunogénica según la reivindicación 22, en la que el adyuvante se selecciona del grupo que consiste en hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, tanto hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, adyuvante incompleto de Freund (IFA), escualeno, alumbre y MF59.
24. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 21, en la que el glicano se compone de un único residuo de azúcar, que es GlcNAc.
25. La composición inmunogénica según la reivindicación 21, en la que la glicoproteína de superficie viral, se selecciona del grupo que consiste de virus sincitial respiratorio humano (RSV) proteínas -viral, RSV F glicoproteína, RSV glicoproteína G, virus de herpes simplex (HSV) proteínas virales , las glicoproteínas del virus del herpes simple gB, gC, gD y gE, Chlamydia MOMP y

PorB antígenos, proteínas del núcleo central, proteína de la matriz u otra proteína del virus del Dengue, la hemaglutinina del virus del sarampión, virus herpes simplex tipo 2 glicoproteína gB, poliovirus I VPL, sobre las glicoproteínas del VIH 1, antígeno de superficie de la hepatitis B, toxina de la difteria, Streptococcus 24M epítipo, gonocócica pilina, g50 virus de la pseudorrabia (gpD), pseudorrabia virus II (GPB), pseudorrabia virus III (GPC), virus de la pseudorrabia glicoproteína H, virus de la pseudorrabia glicoproteína E, gastroenteritis transmisible glicoproteína 195, transmisible proteína de la matriz gastroenteritis por rotavirus porcinos glicoproteína 38, proteína de la cápside del parvovirus porcino, antígeno protector Serpulinahyodysenteriae, diarrea viral bovina glicoproteína 55, Newcastle virus de la enfermedad de hemaglutinina-neuraminidasa, hemaglutinina de la gripe porcina, la neuraminidasa de la gripe porcina, fiebre aftosa virus de la enfermedad , virus del cólera porcino, virus de la gripe porcina, virus de la peste porcina africana, Mycoplasma mycoides subsp. mycoides, virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina infecciosa bovina E virus de la rinotraqueitis glicoproteína, la glicoproteína G, virus de la laringotraqueitis infecciosa, contagiosa G del virus de la laringotraqueitis glicoproteína o glicoproteína I, una glicoproteína de la Crosse virus, neonatal pantorrilla virus de la diarrea, virus de la encefalomiелitis equina venezolana, virus Punta Toro, virus de la leucemia murina, virus del tumor mamario de ratón, la proteína del núcleo del virus de la hepatitis B y el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B o un fragmento o derivado del mismo, el antígeno del virus de la gripe equina o equino virus del herpes, incluyendo equina virus influenza tipo A / Alaska 91 neuraminidasa, equino typeA virus de la influenza / Miami 63 neuraminidasa, la influenza equino de tipo A / Kentucky 81 neuraminidasa tipo de virus del herpes equino 1 glicoproteína B y el herpes equino de tipo 1 glicoproteína D, el antígeno del virus respiratorio sincitial bovino o virus de la parainfluenza bovina, bovina virus respiratorio sincitial proteína de unión (BRSV G), respiratorio proteína de fusión del virus sincicial bovino (BRSV F), bovino virus respiratorio sincitial proteína de la nucleocápside (BRSVN), el virus de tipo proteína 3 de la fusión de la parainfluenza bovina, parainfluenza

bovina de tipo virus de la neuraminidasa 3 hemaglutinina, el virus de la diarrea viral bovina glicoproteína 48 y 53 glicoproteína, la glicoproteína e del virus Dengue y la glicoproteína E1 y E2 del virus de la hepatitis C humana.

26. La composición inmunogénica de la reivindicación 21, en la que el glicano comprende un residuo de fucosa.

27. Un método de obtención de una glicoproteína viral parcialmente glicosilada, comprendiendo el método:

(i) proporcionar una glicoproteína viral, o un fragmento inmunológicamente activo del mismo, que comprende un glicano enlazado a un sitio de glicosilación de la glicoproteína viral, o el fragmento inmunológicamente activo de la misma;

y

(ii) eliminar al menos una porción de los glicanos para formar un glicano truncado, que consiste en uno, dos o tres residuos de azúcar, produciendo de este modo la glicoproteína viral parcialmente glicosilada.

28. El método de la reivindicación 27, en el que en la etapa (ii), se retira la porción del glicano químicamente o enzimáticamente.

29. El método de la reivindicación 27, en el que en la etapa (ii), la porción de glicano se elimina por una glicosidasa, una neuraminidasa, un α -1-manosidasa, una endo FN glicanasa, o una enzima que digiere selectivamente los hidratos de carbono en un sitio de glicosilación N- u O.

30. El método de la reivindicación 27, en el que en la etapa (ii), la porción de la glicano se elimina mediante un método químico que digiere selectivamente los hidratos de carbono en un sitio de glicosilación unido a N u O.

31. El método de la reivindicación 27, en el que la glicoproteína viral se expresa en y es aislado a partir de una célula huésped eucariota.

32. El método de la reivindicación 31, donde la célula hospedadora eucariota se selecciona del grupo que consiste en una célula de levadura, una célula de insecto, una célula de mamífero, y una célula humana.

33. El método de la reivindicación 31, en donde la célula huésped eucariótica es una célula HEK293E.

34. El método de la reivindicación 27 en donde la glicoproteína viral se selecciona del grupo que consiste de hemaglutinina del virus influenza, la proteína M2 del virus de la gripe, virus sincitial respiratorio humano (RSV) proteínas -viral, RSV F glicoproteína, RSV glicoproteína G, virus herpes simplex (HSV) proteínas virales, las glicoproteínas del virus del herpes simple gB, gC, gD, gE y , antígenos de Chlamydia MOMP y PorB, proteína del núcleo, la proteína de la matriz u otra proteína del virus del Dengue, la hemaglutinina del virus del sarampión, virus herpes simplex tipo 2 glicoproteína gB, poliovirus I IVF, glicoproteínas de la envoltura de VIH 1, antígeno de superficie de la hepatitis B, la toxina de la difteria, Streptococcus 24M epítipo, gonocócica pilina, g50 virus de la pseudorrabia (gpD), virus de la pseudorrabia II (GPB), virus de la pseudorrabia III (GPC), virus de la pseudorrabia H glicoproteína, virus de la pseudorrabia glicoproteína E, la gastroenteritis transmisible glicoproteína 195, transmisible proteína de la matriz gastroenteritis, glicoproteína rotavirus porcina 38, la proteína parvovirus porcino cápside, antígeno protector Serpulnahydodysenteriae, la diarrea viral bovina glicoproteína 55, Newcastle virus de la enfermedad de hemaglutinina-neuraminidasa, hemaglutinina de la gripe porcina, la neuraminidasa de la gripe porcina, fiebre aftosa, virus del cólera porcino, virus de la gripe porcina, porcina africana virus de la fiebre , Mycoplasma liyopneutiioniae, virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina infecciosa bovina E virus de la rinotraqueitis glicoproteína, la glicoproteína G, virus de la laringotraqueitis infecciosa, contagiosa G del virus de la laringotraqueitis glicoproteína o glicoproteína I, una glicoproteína del virus de la Crosse, virus de la diarrea neonatal de terneros, virus de la encefalomiелitis equina venezolana, Punta virus toro, virus de la leucemia murina, virus del tumor

mamario de ratón, hepatitis proteína del virus B de núcleo y antígeno de superficie del virus de la hepatitis B o un fragmento o derivado del mismo, el antígeno del virus de la gripe equina o un virus del herpes equino, incluyendo el tipo de virus de la influenza equina a / Alaska 91 neuraminidasa , el virus de la gripe equina typeA / Miami 63 neuraminidasa, influenza equino de tipo A / Kentucky 81 neuraminidasa tipo virus herpes equino 1 glicoproteína B, y herpes equino de tipo 1 glicoproteína D, el antígeno del virus sincitial respiratorio bovino o virus de la parainfluenza bovina, respiratorio sincitial bovino proteína de unión del virus (BRSV G), respiratorio proteína bovina fusión del virus sincitial (BRSV F), respiratorio bovino proteína virus sincitial nucleocápside (BRSVN), parainfluenza bovina de tipo virus de la proteína 3 de fusión, parainfluenza bovina virus tipo 3 hemaglutinina neuraminidasa, viral bovina glicoproteína del virus de la diarrea 48 y 53 de la glicoproteína, la glicoproteína e del virus Dengue y la glicoproteína E1 y E2 del virus de la hepatitis C humana.

35. El método de la reivindicación 27, que comprende además la formulación de la glicoproteína viral parcialmente glicosilada o fragmento inmunológicamente activo de la misma producida en la etapa (ii) en una composición inmunogénica, que comprende además un adyuvante.

36. El método de la reivindicación 35, en el que el adyuvante se selecciona del grupo que consiste en hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, tanto hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, adyuvante incompleto de Freund (IFA), escualeno, alumbre y MF59.

ANEXO A

A



B



C



D



A: mono-glycosylated HA
B: di-glycosylated HA
C: tri-glycosylated HA
D: fully-glycosylated HA

ANEXO B

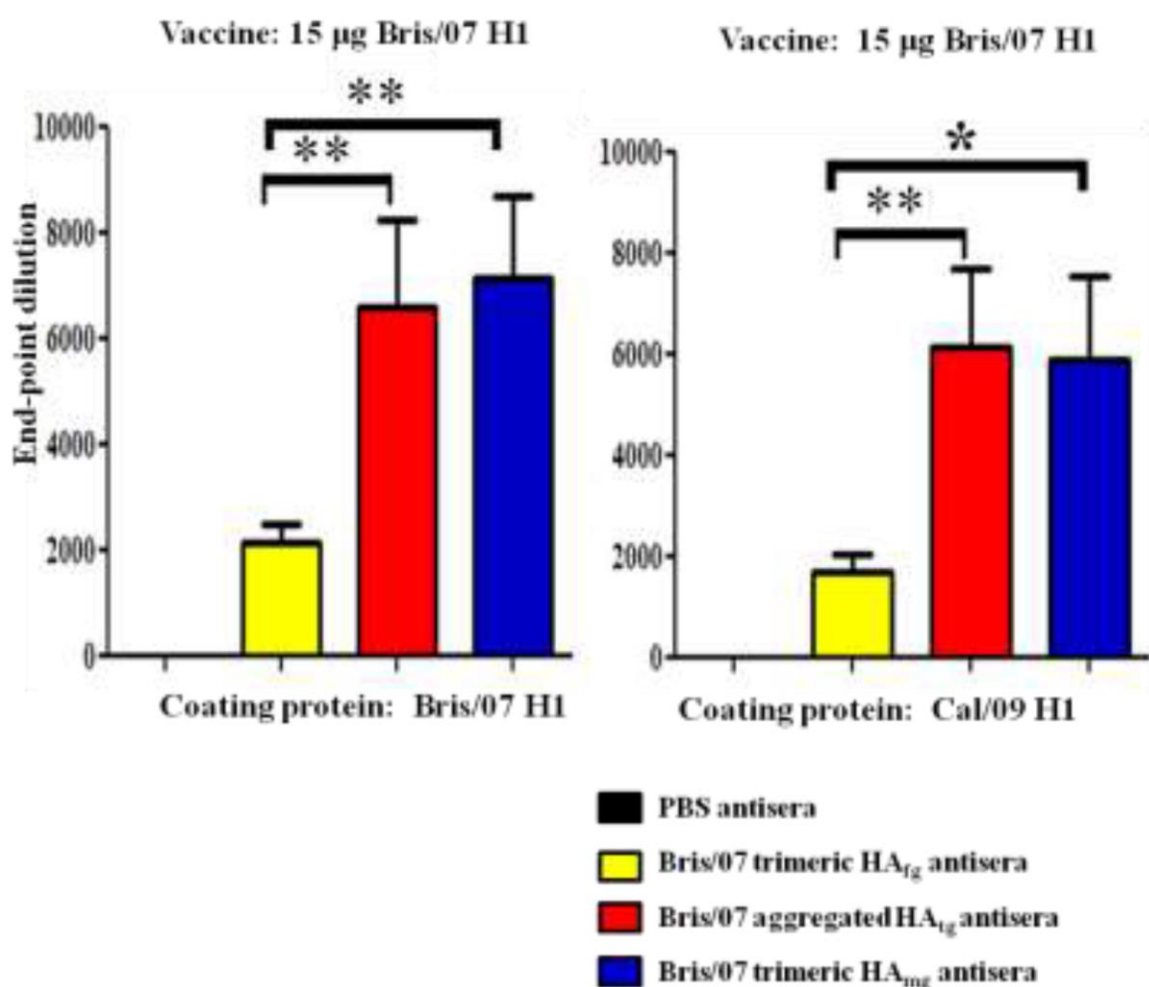


Fig A shows that the antibodies titers from the mice vaccinated with Bris/07 trimeric HA_fg, aggregated HA_fg, and trimeric HA_{mg} were analyzed using enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA).

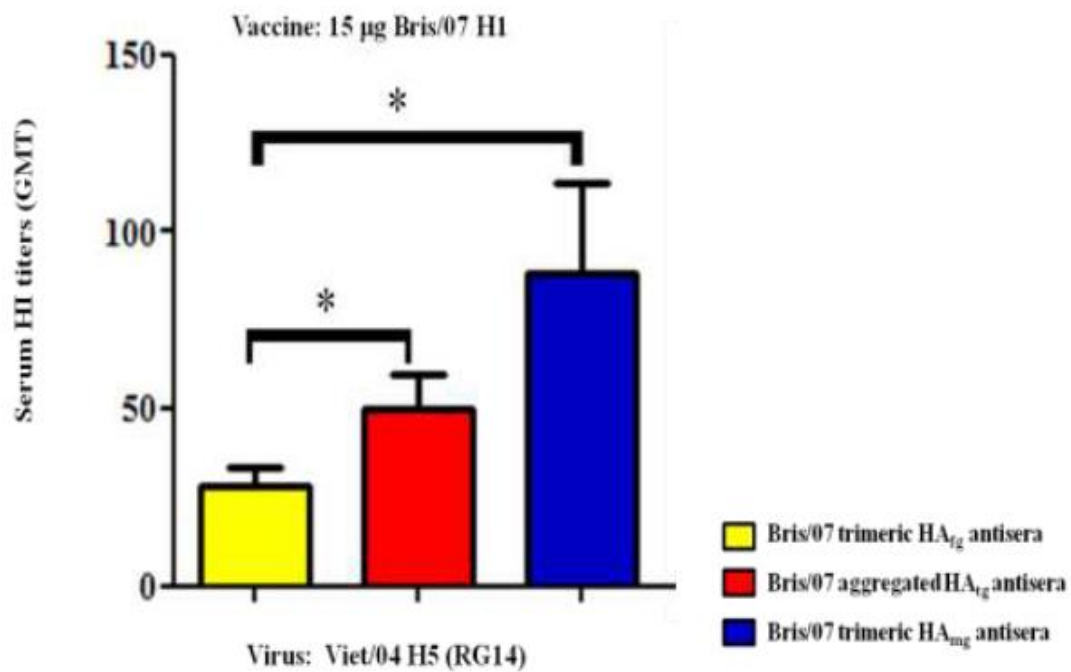


Fig B shows that the antibodies titers from the mice vaccinated with Bris/07 trimeric HAfg, aggregated HA_{tg}, and trimeric HA_{mg} were analyzed using hemagglutination inhibition assays.

N- and O-linked Protein Glycosylation

"N-Linked "

All N-linked carbohydrates are linked through N-Acetylglucosamine and the amino acid asparagine as shown in Figure 1.

The N-linked amino acid consensus sequence is Asn-any AA- Ser or Thr. The middle amino acid can not be proline (Pro).

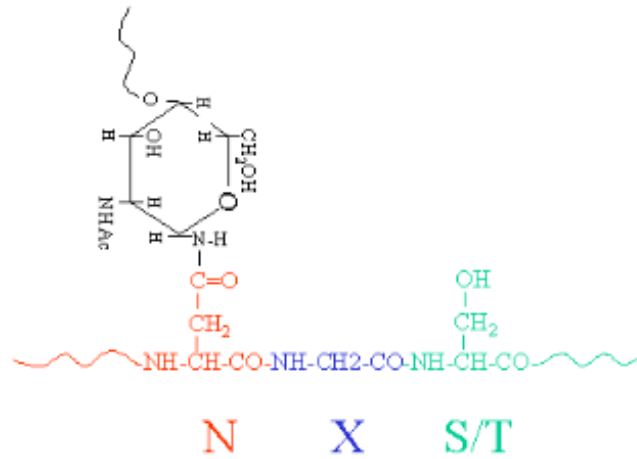


Figure 1

"O-Linked "

Most O-linked carbohydrate covalent attachments to proteins involve a linkage between the monosaccharide N- Acetylgalactosamine and the amino acids serine or threonine.

Currently there is not an O-linked amino acid consensus sequence.

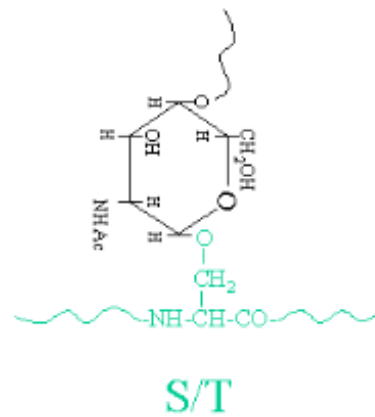


Figure 2