

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 791**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/145** (2006.01)

**C12Q 1/70** (2006.01)

**C07H 21/04** (2006.01)

**C12N 7/00** (2006.01)

**C07K 14/11** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.07.2006 PCT/US2006/029575**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.02.2007 WO07019094**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.07.2006 E 06813248 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 1924281**

54 Título: **Virus influenza modificado para monitorear y mejorar la eficiencia de la vacuna**

30 Prioridad:

**04.08.2005 US 705808 P**

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

**28.10.2019**

73 Titular/es:

**ST. JUDE CHILDREN'S RESEARCH HOSPITAL  
(100.0%)  
262 Danny Thomas Place  
Memphis, TN 38105, US**

72 Inventor/es:

**HOFFMANN, ERICH;  
LIPATOV, ALEKSANDR S.;  
WEBSTER, ROBERT G.;  
WEBBY, RICHARD J. y  
GOVORKOVA, ELENA A.**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 728 791 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Virus influenza modificado para monitorear y mejorar la eficiencia de la vacuna

En un sentido general, la descripción se refiere a incrementar la antigenicidad y/o inmunogenicidad de un grupo de subtipos de virus influenza.

## 5 Virus influenza

Los virus influenza, especialmente cepas particulares de virus A y B, son una causa grave de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, que producen brotes anuales de enfermedad. Periódicamente, aunque a intervalos irregulares, se producen pandemias y el resultado son niveles particularmente elevados de enfermedad y muerte. Las pandemias históricamente han sido el resultado de nuevos subtipos de virus de influenza A, creados por la redistribución del genoma segmentado (salto antigénico), mientras que las epidemias anuales son generalmente el resultado de la evolución de los antígenos superficiales de los virus influenza A y B (deriva antigénica). Los virus influenza humanos con frecuencia se originan a partir de cepas aviares de virus influenza, por lo que la infección de influenza es fundamentalmente una zoonosis. También existen pruebas de que el cerdo puede actuar como anfitrión intermedio (“vehículo de mezcla”), que genera nuevas cepas de origen aviar que resultan patogénicas en el ser humano (Scholtissek et al., *Virology* 1985, 147:287). El brote de influenza H5N1 en Hong Kong de 1997 demostró que los virus influenza A altamente patogénicos también pueden transmitirse directamente desde especies de ave hasta el ser humano (Claas et al., *Lancet* 1998, 351:472; Suárez et al., *J. Virol.* 1998, 72:6678; Subbarao et al., *Science* 1998, 279:393; Shorridge, *Vaccine* 1999, 17 (supl. 1): S26-S29). En 2003, los virus H5N1 en el sudeste asiático comprendían diferentes genotipos cocirculantes, aunque en 2004 un único fenotipo, conocido como “genotipo Z”, se volvió dominante (Li et al., *Nature* 2004, 430:209). La evidencia actual indica que mueren personas por la transmisión directa de este genotipo entre aves y seres humanos, y que también infecta gatos, con transmisión directa de gato a gato (Kuiken et al., *Science* 2004, 306:241). Estas y otras pruebas sobre el espectro variable de anfitriones y de la distribución generalizada de este virus han suscitado inquietud sobre si los virus H5N1 pueden adquirir características que permitan la transmisión de persona a persona. El ser humano no poseería inmunidad alguna frente a tales nuevos virus H5N1, lo que podría causar influenza pandémica catastrófica (Fouchier et al., *Nature* 2005, 435:419). El potencial de los virus influenza A de generar nuevas cepas patogénicas a partir de un gran número de cepas circulantes en reservorios humanos indica que el control de la enfermedad requiere monitorear estos virus y desarrollar terapias y vacunas antivirales mejoradas. La velocidad con la que se desarrollan las nuevas cepas virales exige vigilancia en este esfuerzo de monitoreo, que incluya técnicas mejoradas de evaluación de la eficacia de las vacunas para las nuevas cepas.

La totalidad de los virus influenza A, B y C, de la familia *Orthomyxoviridae*, presenta un genoma de ARN de cadena negativa segmentado que se replica en el núcleo de la célula infectada; presentan una capacidad codificante combinada de aproximadamente 13 kb y contienen la información genética para diez proteínas virales. Específicamente, los virus influenza poseen ocho segmentos génicos de ARN de sentido negativo (ARNsn) que codifican al menos 10 polipéptidos, entre ellos las proteínas de ARN polimerasa dirigida a ARN (PB2, PB1 y PA), nucleoproteína (NP), neuraminidasa (NA) y hemaglutinina (HA, que después del corte enzimático se constituye como asociación de las subunidades HA1 y HA2), proteínas de matriz (M1 y M2) y proteínas no estructurales (NS1 y NS2) (Krug et al., en: *The Influenza Viruses*, R.M., Krug, ed., Plenum Press, New York, 1989, páginas 89-152).

Los sistemas de genética inversa desarrollados recientemente han permitido manipular el genoma del virus influenza (Palese et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996, 93:11354; Neumann y Kawakita, *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 la expresión controlada por plásmido de ocho ARNsn de influenza a partir de un promotor pol I y la coexpresión de las proteínas del complejo de polimerasa dan como resultado la formación de virus influenza A infeccioso (Hoffmann et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000, 97:6108).

La partícula viral del virus influenza presenta un tamaño de aproximadamente 125 nm y consiste en un núcleo de ARN vírico de sentido negativo asociado a la nucleoproteína, circundado por una cubierta viral con una estructura de bicapa lipídica. La capa interna de la cubierta viral está compuesta principalmente de proteínas matriciales y la capa externa contiene la mayor parte del material lipídico derivado del anfitrión. Las denominadas “proteínas superficiales” neuraminidasa (NA) y hemaglutinina (HA) aparecen como espículas sobre la superficie del cuerpo vírico. La infectividad de los nuevos virus influenza depende del corte de la HA por proteasas específicas del anfitrión, mientras que la NA participa en la liberación de viriones de progenie desde la superficie celular y evita la aglutinación de los virus de nueva formación.

Las proteínas HA y NA incluidos en la cubierta viral son los determinantes antigénicos principales del virus influenza (Air et al., *Structure, Function, and Genetics*, 1989, 6:341-356; Wharton et al., en: *The Influenza Viruses*, R. M. Krug, ed., Plenum Press, New York, 1989, páginas 153-174). Debido a la redistribución del genoma segmentado del virus influenza, se crean constantemente nuevas variantes de HA y NA para las que un organismo recién infectado no presenta respuesta inmunológica anamnésica. La glucoproteína HA es el antígeno principal para los anticuerpos neutralizadores y participa en la unión de las partículas virales a receptores sobre las células anfitrionas.

Las moléculas de HA procedentes de diferentes cepas virales muestran una similitud significativa de las secuencias tanto a nivel de ácido nucleico como de aminoácido. Este nivel de similitud varía al comparar cepas de diferentes subtipos, mostrando claramente algunas cepas niveles más elevados de similitud que otras (Air, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981, 78:7643). Los niveles de similitud de aminoácidos varían entre las cepas virales de un subtipo y las cepas virales de otros subtipos (Air, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981, 78:7643). Esta variación resulta suficiente para establecer subtipos discretos y el linaje evolutivo de las diferentes cepas, aunque las secuencias de ADN y de aminoácidos de diferentes cepas todavía pueden alinearse fácilmente utilizando técnicas convencionales de bioinformática (Air, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981, 78:7643; Suzuki y Nei, Mol. Biol. Evol. 2002, 19:501).

#### Vacunas de la influenza

10 Las vacunas de la influenza actualmente autorizadas por las autoridades sanitarias para el uso en los Estados Unidos y en Europa son vacunas de la influenza inactivadas, así como la vacuna FLUMIST viva atenuada en los Estados Unidos. Se cultivan virus que presentan cepas epidemiológicamente importantes de influenza A y de influenza B en huevos embrionados de gallina y posteriormente las partículas virales se purifican y se inactivan por medios químicos para producir reservas de vacuna. Cada año, la OMS selecciona los subtipos que más probablemente circularán para ese año para el desarrollo de una vacuna.

Aunque las vacunas de la influenza se han utilizado desde principios de los años 1940 para la vacunación humana y desde finales de los 1960 para la vacunación equina, la existencia de grandes reservorios animales, en combinación con la amenaza de la aparición de nuevos virus influenza capaces de causar una pandemia, ha estimulado la investigación de nuevas terapias con las que combatir el virus. Se han producido varios avances importantes en el campo de la influenza en los últimos pocos años (revisión en Cox y Subbarao, Lancet 1999, 354:1277-82). Por ejemplo, una vacuna de la influenza trivalente administrada por vía intranasal viva atenuada se ha demostrado que resulta altamente eficaz en la protección de niños pequeños frente a la influenza A H3N2 y la influenza B. Entre otros enfoques para mejorar la eficacia de las vacunas de virus influenza actuales (muertas) se incluyen la generación de virus influenza adaptadas al frío y manipuladas genéticamente que contienen mutaciones atenuantes específicas (revisión en Palese et al., J. Infect. Dis., 1997, 176 supl. 1:S45-9). En Lipatov et al. (J. Infect. Dis., 2005, 191:S1216-20) se somete a ensayo en un modelo de ratón letal la eficacia de las vacunas de la influenza H5 producidas mediante genética inversa. Se espera que estos virus alterados genéticamente, en los que los genes de HA y NA de cepas circulantes se han incorporado mediante redistribución, puedan utilizarse como vacunas de virus influenza vivas seguras para inducir una respuesta inmunológica protectora de larga duración en el ser humano. Aunque las vacunas adaptadas al frío aparentemente son eficaces en niños y adultos jóvenes, podrían encontrarse excesivamente atenuadas para estimular una respuesta inmunológica ideal en personas de edad avanzada, el grupo principal de las 20000-40000 personas en EE.UU. que muere cada año como consecuencia de la infección por influenza.

Las vacunas fácilmente disponibles proporcionarían la herramienta más eficaz contra una pandemia emergente de influenza. Tras el brote de H5N1 en Hong Kong, se han sometido a ensayo en seres humanos vacunas producidas mediante dos enfoques diferentes. La vacuna de subunidad H5 convencional producida a partir de A/duck/Singapore/3/97 era poco inmunogénica en el ser humano, incluso contra cepas estrechamente relacionadas antigénicamente y después de múltiples vacunaciones (Nicholson et al., Lancet 2001, 357:1937; Stephenson et al., Journal of Infectious Disease 2005, 191:1210). La utilización del adyuvante MF59 incrementa el título de anticuerpos de dicha vacuna H5 (Stephenson et al., Vaccine 2003, 21:1687). La vacunación con vacuna "fragmentada" inactivada derivada de virus A/duck/HK/836/80 (H3N1) no patogénico y la hemaglutinina H5 modificada procedente de virus A/HK/156/97 (H5N1) indujo títulos apenas detectables de anticuerpos neutralizadores (Takada et al., Journal of Virology 1999, 73:8303). Por tanto, aunque estas vacunas H5N1 resultaron bien toleradas, aparentemente eran poco inmunogénicas. La falta actual de vacunas eficaces contra las cepas de virus H5N1 incrementa la amenaza de que estos virus causen una pandemia.

#### 45 Inmunogenicidad de las vacunas de la influenza

Los métodos de titulación sérica de anticuerpos son las medidas sustitutivas aceptadas de protección inmunológica tras la vacunación o la infección vírica. Los métodos de titulación sérica de anticuerpos utilizados principalmente son los ensayos de titulación de neutralización del virus y los ensayos de titulación de la inhibición de la hemaglutinina (HI). Estos ensayos se basan en la capacidad de los anticuerpos de influenza procedentes de suero humano de reaccionar cruzadamente con antígenos bajo condiciones *in vitro*. Los ensayos se seleccionan para una situación dada basándose no sólo en su capacidad de proporcionar resultados consistentes y aplicables, sino también basándose en su facilidad de uso y los requisitos de instalaciones para cada tipo de ensayo.

Brevemente, el ensayo de neutralización del virus analiza la capacidad de los anticuerpos en una muestra de suero de bloquear en células en cultivo la infección por virus influenza. El ensayo se lleva a cabo creando diluciones en serie (títulos) de una muestra de suero y combinando cada una de estas diluciones con una cantidad estándar de virus infeccioso. A continuación, se presenta cada dilución de la mezcla a un cultivo celular definido y se someten a ensayo las tasas de infección resultantes. El ensayo de titulación de la neutralización del virus se considera un ensayo extremadamente útil y fiable para analizar el nivel de anticuerpos inmunoprotectores presentes en un individuo dado. Sin embargo, depende de instalaciones especializadas de cultivo celular y, por tanto, no se encuentra disponible universalmente. La metodología también es laboriosa y exige mucho tiempo, por lo que resulta poco adecuada para

el cribado de un número grande de muestras.

De manera similar, el ensayo de inhibición de la hemaglutinina (HI) analiza la capacidad de los anticuerpos en una muestra de suero de unirse a un virus de referencia estandarizado. El fundamento de este ensayo es el hecho de que los virus influenza se unirán y aglutinarán los eritrocitos. En el ensayo de HI, se mezclan diluciones en serie de la muestra de suero con cantidades estándares de virus de referencia y, después de un periodo de incubación fijado, se añaden a eritrocitos. A continuación, se detecta visualmente la asociación formando complejos entre los virus de referencia y eritrocitos. La dilución más alta de suero que consigue inhibir la hemaglutinina se recoge como el título de inhibición de la hemaglutinina. Aunque no es tan sensible de la inmunogenicidad de la vacuna como otros ensayos, el ensayo de HI es ampliamente utilizado debido a sus requisitos relativamente simples de tecnología y de laboratorio.

- 5
- 10 Dadas las limitaciones comentadas anteriormente de las técnicas actualmente disponibles para el desarrollo y evaluación de vacunas de la influenza, existe una necesidad de mejoras de las técnicas de evaluación de la inmunogenicidad para analizar la respuesta inmunológica tras la infección, así como la eficacia vacunal.

La presente invención se refiere a las realizaciones definidas en las reivindicaciones.

- 15 Un aspecto de la presente invención se refiere a una molécula de hemaglutinina (HA) de virus influenza A H5 que comprende una sustitución de aminoácido en el sitio de unión a receptores, en el que la molécula HA sustituida comprende el aminoácido asparagina en la posición correspondiente a la posición 223 en la HA H5, en donde la molécula HA no se origina con el aislado de H5 humano A/HK/213/03 y la inclusión de asparagina en la posición 223 da como resultado una reactividad incrementada con antisueros obtenidos a partir de un animal expuesto a un virus influenza.

- 20 La invención se refiere además a un virus influenza recombinante que comprende la molécula HA de virus influenza de la invención.

La presente invención proporciona además un kit de ensayo de inhibición de la hemaglutinina (HI) que comprende el virus influenza recombinante de la invención.

- 25 La invención proporciona además un método de producción de un virus influenza que contiene la molécula HA de virus influenza A H5 de la invención, método que comprende introducir un vector recombinante que expresa la molécula HA del virus influenza A H5 de la invención en un sistema de genética inversa.

- 30 Se encuentra comprendido adicionalmente en la presente invención una etapa de método en un método para determinar la eficacia de un virus de virus influenza en un animal, en donde dicha etapa de método comprende hacer reaccionar antisueros obtenidos a partir de un animal vacunado con una molécula de hemaglutinina (HA) de virus influenza A H5 que comprende una sustitución de aminoácido en el sitio de unión a receptores, en donde la molécula de HA sustituida comprende el aminoácido asparagina en la posición correspondiente a la posición 223 en HA H5, en donde la molécula de HA no se origina con el aislado H5 humano A/HK/213/03 y la inclusión de la asparagina en la posición 223 da como resultado una reactividad incrementada con los antisueros obtenidos a partir de un animal expuesto a un virus influenza.

- 35 La invención se refiere además a un método para producir un virus influenza que comprende una molécula de hemaglutinina (HA) de virus influenza A H5, método que comprende cultivar un sistema de genética inversa en el que el ADN codificante de la HA del virus influenza A H5 codifica una sustitución de aminoácido en el sitio de unión a receptores, en donde la molécula de HA sustituida comprende el aminoácido asparagina en la posición correspondiente a la posición 223 en la HA H5, en donde la molécula de HA no se origina con el aislado de H5 humano A/HK/213/03 y la inclusión de asparagina en la posición 223 da como resultado una reactividad incrementada con antisueros obtenidos a partir de un animal expuesto a un virus influenza.

- 40 La invención se refiere además a un método para incrementar la sensibilidad de un ensayo de inhibición de la hemaglutinina (HI), método que comprende hacer reaccionar antisueros obtenidos a partir del animal vacunado o infectado con una molécula de hemaglutinina (HA) de virus influenza A H5 que comprende una sustitución de aminoácido en el sitio de unión a receptores, en donde la molécula de HA sustituida comprende el aminoácido asparagina en la posición correspondiente a la posición 223 en la HA H5, en donde la molécula de HA no se origina con el aislado de H5 humano A/HK/213/03 y la inclusión de asparagina en la posición 223 da como resultado una reactividad incrementada con antisueros obtenidos a partir de un animal expuesto a un virus influenza.

- 45 La invención se refiere además a un método *in vitro* para determinar si un animal ha sido expuesto a un virus influenza, método que comprende hacer reaccionar antisueros obtenidos a partir del animal con un virus de referencia diagnóstico, que se deriva del virus influenza en cuestión pero que comprende una molécula de hemaglutinina (HA) de virus influenza A H5 que comprende una sustitución de aminoácido en el sitio de unión a receptores, en donde la molécula de HA sustituida comprende el aminoácido asparagina en la posición correspondiente a la posición 223 en la HA H5, en donde la molécula de HA no se origina con el aislado de H5 humano A/HK/213/03 y la inclusión de asparagina en la posición 223 da como resultado una reactividad incrementada con los antisueros obtenidos a partir de un animal expuesto a un virus influenza.
- 50
- 55

La presente invención proporciona además un método para determinar si un animal ha sido expuesto a un virus influenza, método que comprende hacer reaccionar antisueros obtenidos a partir del animal con un virus de referencia diagnóstico, que se deriva del virus influenza en cuestión pero que comprende una molécula de HA de virus influenza A H5 que comprende el aminoácido asparagina en la posición correspondiente a la posición 223 en la HA H5, en donde la molécula de HA no se origina con el aislado de H5 humano A/HK/213/03 y la inclusión de asparagina en la posición 223 da como resultado una reactividad incrementada con los antisueros obtenidos a partir de un animal expuesto a un virus influenza.

La invención proporciona además un virus de vacuna para la influenza que comprende una molécula de hemaglutinina (HA) de virus influenza A H5 que comprende una sustitución de aminoácido en el sitio de unión a receptores, en el que la molécula HA sustituida comprende el aminoácido asparagina en la posición correspondiente a la posición 223 en la HA H5, en donde la molécula HA no se origina con el aislado de H5 humano A/HK/213/03 y la inclusión de asparagina en la posición 223 da como resultado una reactividad incrementada con antisueros obtenidos a partir de un animal expuesto a un virus influenza.

La presente invención proporciona además un ácido nucleico aislado codificante de la molécula de HA del virus influenza A H5 de la invención, así como un método para preparar dicho ácido nucleico; el método comprende introducir una secuencia de nucleótidos en un ácido nucleico codificante de la molécula de HA del virus influenza A H5 que no presenta la sustitución de aminoácido en el sitio de unión a receptores, que da como resultado una sustitución de aminoácido, en donde la molécula de HA H5 sustituida comprende el aminoácido asparagina en la posición correspondiente a la posición 223 en la HA H5.

La invención se refiere además a la molécula de HA del virus influenza A H5 de la invención para el uso como medicamento en el tratamiento o la prevención de una infección por virus influenza, así como al uso de una molécula de HA de virus influenza A H5 de la invención en la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de una infección por virus influenza.

La invención se refiere además a un virus influenza recombinante que comprende la molécula de HA del virus influenza A H5 de la invención para el uso como medicamento en el tratamiento o la prevención de una infección por virus influenza, y al uso de un virus influenza recombinante que comprende la molécula de HA del virus influenza A H5 de la invención en la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de una infección por virus influenza.

La presente descripción proporciona sustituciones de aminoácidos en la molécula de hemaglutinina (HA) del virus influenza A que pueden alterar la antigenicidad e inmunogenicidad de la HA. Estas sustituciones pueden alterar sitios antigénicos mediante la alteración de la especificidad de receptores y/o la unión anticuerpo-antígeno. En una diversidad de realizaciones, la antigenicidad incrementada que resulta de la sustitución puede resultar útil para incrementar la sensibilidad del ensayo de hemaglutinina (HA) en suero obtenido de animales infectados. Esta información resulta importante en la producción de virus de referencia diagnósticos y nuevas vacunas para la influenza. Preferiblemente, la sustitución de aminoácido da como resultado moléculas con las características de inmunogenicidad de la sustitución de aminoácido de la asparagina en la posición 223 de la HA H5.

Por tanto, en determinados aspectos, la presente descripción incluye una molécula de hemaglutinina (HA) de virus influenza que comprende una o más sustituciones de aminoácidos en el sitio de unión a receptores que provoca que la molécula de HA resulte más antigénica con respecto a anticuerpos específicos para la molécula de HA que no presenta la sustitución de aminoácido en su sitio de unión a receptores. La molécula de HA de virus influenza de antigenicidad incrementada puede incluir el aminoácido asparagina en la posición correspondiente a la posición 223 en la HA H5, en donde la inclusión de asparagina da como resultado una reactividad incrementada con antisueros obtenidos a partir de un animal expuesto a un virus influenza con una molécula de HA de tipo silvestre. La molécula de HA de virus influenza de antigenicidad incrementada puede incluir el aminoácido asparagina en la posición correspondiente a la posición 223 en la HA H5, en donde la molécula de HA no se origina con el aislado H5 humano A/HK/213/03 y la inclusión de asparagina en la posición 223 da como resultado una reactividad incrementada con antisueros obtenidos a partir de un animal expuesto a un virus influenza. En algunas realizaciones, la sustitución de aminoácido altera un sitio de glucosilación. En algunas realizaciones, el virus influenza es un virus influenza A humano. Por ejemplo, el virus influenza A humano puede ser un miembro del subtipo H5. El virus influenza A humano puede ser un virus A/Vietnam/1203/04 (H5N1). En algunas realizaciones, el virus influenza es un virus influenza B. La descripción incluye moléculas de HA de virus influenza de antigenicidad incrementada que se deriva de un virus influenza aviar.

En otros aspectos, la descripción incluye un virus influenza recombinante que comprende una molécula de hemaglutinina (HA) de virus influenza que comprende una o más sustituciones de aminoácido en el sitio de unión a receptores que provoca que la molécula de HA resulte más antigénica con respecto a anticuerpos específicos para la molécula de HA que no presenta la sustitución de aminoácido en su sitio de unión a receptores. El virus recombinante puede incluir una molécula de HA modificada derivada del virus influenza H5N1 en el fondo genético de un virus influenza A. El virus influenza A puede ser un virus de cepa maestra. El virus recombinante puede utilizarse como virus de referencia diagnóstico en un ensayo de inhibición de la hemaglutinina (HI). El virus influenza recombinante puede incluirse en un kit de ensayo de inhibición de hemaglutinina (HI).

Entre aspectos todavía adicionales de la descripción se incluyen sistemas de genética inversa para producir un virus que contiene una molécula de hemaglutinina (HA) de virus influenza que comprende una sustitución de aminoácido en el sitio de unión a receptores que provoca que la molécula de HA resulte más antigénica con respecto a anticuerpos específicos para la molécula de HA que no presenta la sustitución de aminoácido en su sitio de unión a receptores.

5 Todavía otros aspectos de la descripción descrita en la presente memoria incluyen un virus que contiene una molécula de hemaglutinina (HA) de virus influenza que comprende una o más sustituciones de aminoácido en el sitio de unión a receptores que provoca que la molécula de HA resulte más antigénica con respecto a anticuerpos específicos para la molécula de HA que no presenta la sustitución de aminoácido en su sitio de unión a receptores. En algunas realizaciones, el método comprende introducir un vector recombinante que expresa la molécula de HA de antigenicidad incrementada en un sistema de genética inversa.

10 En aspectos relacionados, la descripción proporciona además métodos para determinar la eficacia de una vacuna de virus influenza en un animal. En algunas realizaciones, el método comprende hacer reaccionar antisueros obtenidos a partir de un animal vacunado con una molécula de hemaglutinina (HA) de virus influenza que comprende una o más sustituciones de aminoácidos en el sitio de unión a receptores que provoca que la molécula de HA sea más antigénica con respecto a anticuerpos específicos para la molécula de HA que no presenta la sustitución de aminoácido en el sitio de unión a receptores que se encuentra presente en la vacuna de virus influenza. En algunas realizaciones, la molécula de HA de antigenicidad incrementada se origina con el aislado de H5N1 humano A/HK/213/03 y la inclusión de asparagina en la posición que corresponde a la posición 223 en HA del virus H5N1 da como resultado una reactividad incrementada con antisueros obtenidos a partir del animal vacunado. En algunas realizaciones, el animal es un ser humano. En otras realizaciones, el animal es un hurón.

15 Todavía otros aspectos relacionados de la presente descripción proporcionan métodos para producir un virus influenza que comprende una molécula de hemaglutinina (HA), método que comprende cultivar un sistema de genética inversa en el que el ADN codificante de HA codifica una o más sustituciones de aminoácidos en el sitio de unión a receptores que provoca que la molécula de HA sea más antigénica con respecto a anticuerpos específicos para la molécula de HA que no presenta la sustitución de aminoácido en el sitio de unión a receptores mediante un procedimiento de genética inversa.

20 La descripción proporciona además métodos para incrementar la sensibilidad de un ensayo de inhibición de la hemaglutinina (HI), método que comprende hacer reaccionar antisueros obtenidos a partir del animal vacunado o infectado con una molécula de hemaglutinina (HA) del virus influenza que comprende una o más sustituciones de aminoácidos en el sitio de unión a receptores que provoca que la molécula de HA sea más antigénica con respecto a anticuerpos específicos para la molécula de HA que no presenta la sustitución de aminoácido en el sitio de unión a receptores. En algunas realizaciones, el método para incrementar la sensibilidad de un ensayo de HI da como resultado un incremento de al menos 2 veces en la sensibilidad de un ensayo de inhibición de la hemaglutinina (HI). En algunas realizaciones, el método para incrementar la sensibilidad de un ensayo de HI da como resultado un incremento de al menos 4 veces en la sensibilidad de un ensayo de inhibición de la hemaglutinina (HI).

25 Otro aspecto de la descripción incluye métodos para determinar si un animal ha sido expuesto a un virus influenza. En algunas realizaciones, el método comprende hacer reaccionar antisueros obtenidos a partir del animal con un virus de referencia diagnóstico, que se deriva del virus influenza en cuestión pero comprende una molécula de hemaglutinina (HA) del virus influenza que comprende una sustitución de aminoácido en el sitio de unión a receptores que provoca que la molécula de HA sea más antigénica con respecto a anticuerpos específicos para la molécula de HA que no presenta la sustitución de aminoácido en su sitio de unión a receptores dando como resultado una reactividad incrementada con los antisueros. En algunas realizaciones, el animal es un ser humano. En otras realizaciones, el animal es un hurón.

30 La descripción incluye, en todavía otros aspectos, métodos para determinar si un animal ha sido expuesto a un virus influenza. En algunas realizaciones, el método comprende hacer reaccionar antisueros obtenidos a partir del animal con un virus de referencia diagnóstico, que se deriva del virus influenza en cuestión pero que comprende una molécula de HA de virus influenza modificada que comprende el aminoácido asparagina en la posición correspondiente a la posición 223 en la HA H5, en donde la inclusión de asparagina da como resultado una reactividad incrementada con antisueros obtenidos a partir de un animal expuesto a un virus influenza con una molécula de HA de tipo silvestre, dando como resultado una reactividad incrementada con los antisueros. En algunas realizaciones, el método para determinar si un animal ha sido expuesto a un virus influenza incluye hacer reaccionar antisueros obtenidos a partir del animal con un virus de referencia diagnóstico, que se deriva del virus influenza en cuestión pero comprende una molécula de HA de virus influenza modificada que comprende el aminoácido asparagina en la posición correspondiente a la posición 223 en la HA H5, en donde la molécula de HA no se origina con el aislado de H5 humano A/HK/213/03 y la inclusión de asparagina en la posición 223 da como resultado una reactividad incrementada con antisueros obtenidos a partir de un animal expuesto a un virus influenza. En algunas realizaciones, el animal es un ser humano. En otras realizaciones, el animal es un hurón.

35 También se encuentran incluidos en la descripción virus de vacuna de influenza que comprenden una molécula de hemaglutinina (HA) que comprende una sustitución de aminoácido en el sitio de unión a receptores que provoca que la molécula de HA sea más antigénica con respecto a anticuerpos específicos para la molécula de HA que no presenta

la sustitución de aminoácido en el sitio de unión a receptores y en donde la modificación da como resultado una inmunogenicidad incrementada de dicho virus de vacuna.

Un aspecto de la presente descripción incluye ácidos nucleicos aislados codificantes de una molécula de hemaglutinina (HA) de virus influenza que comprende una sustitución de aminoácido en el sitio de unión a receptores que provoca que la molécula de HA sea más antigénica con respecto a anticuerpos específicos para la molécula de HA que no presenta la sustitución de aminoácido en su sitio de unión a receptores. En algunas realizaciones, la molécula de HA del virus influenza codificada por el ácido nucleico aislado comprende un aminoácido asparagina en la posición correspondiente a la posición 223 en la HA H5, en donde la molécula de HA no se origina con el aislado de H5 humano A/HK/213/03 y la inclusión de asparagina en la posición 223 da como resultado una reactividad incrementada con antisueros obtenidos a partir de un animal expuesto a un virus influenza.

La descripción incluye además métodos para preparar ácidos nucleicos codificantes de una molécula de hemaglutinina (HA) de virus influenza que comprende una sustitución de aminoácido en el sitio de unión a receptores que provoca que la molécula de HA sea más antigénica con respecto a anticuerpos específicos para la molécula de HA que no presenta la sustitución de aminoácido en su sitio de unión a receptores. En algunas realizaciones, el método comprende introducir una secuencia de nucleótidos en un ácido nucleico codificante de la molécula de HA que no presenta la sustitución de aminoácido en el sitio de unión a receptores, que da como resultado una sustitución de aminoácido en la secuencia de la molécula de HA que provoca que la molécula de HA sea más antigénica con respecto a anticuerpos para la molécula de HA que no presenta la sustitución de aminoácido.

La FIG. 1 es un gráfico que indica los títulos de anticuerpo de HI en hurones inoculados con virus influenza H5N1 aislados en 2003 y 2004 (A); títulos neutralizadores de HI y de virus en hurones inmunizados con virus  $\Delta$ H5N1/03 y  $\Delta$ H5N1/04 (B). En la FIG. 1A, se recogieron sueros el día 28 después de la inoculación con  $10^6$  EID<sub>50</sub> de virus H5N1 y se titularon frente a 4 unidades hemaglutinantes (UHA) de virus homólogo. Los datos son valores representativos de dos o 4 sueros. En la FIG. 1B, se recogieron sueros de hurones vacunados x2 con 7  $\mu$ g de HA de virus  $\Delta$ H5N1/03 y  $\Delta$ H5N1/04 y se titularon frente a 4 UHA y 100 TCID<sub>50</sub> de virus homólogos, respectivamente.

La FIG. 2 es un gráfico que indica los títulos virales en lavados nasales de hurones vacunados y de control tras el reto con virus A/Vietnam/1203/04 (H5N1). Hurones vacunados con virus recombinantes  $\Delta$ H5N1/04 o  $\Delta$ H5/04 se inocularon por vía intranasal con  $10^6$  EID<sub>50</sub> de virus A/Vietnam/1203/04. Los títulos son valores medios ( $\log_{10}$  EID<sub>50</sub>/0,1ml)  $\pm$  SD determinados en los lavados nasales de 3 hurones.

Obsérvese que las diferencias de títulos entre grupos vacunados y de control son significativas con valores de P de 0,0028 a 0,0173 según los resultados de las pruebas t no apareadas.

La FIG. 3 es un modelo molecular del polipéptido HA H5 que muestra la posición del aminoácido en las posiciones 154 y 223 en la estructura 3D de la HA del virus A/duck/Singapore/3/97 (H5N3). En la fig. 3A, se indica el sitio de unión a receptores de los aminoácidos en la estructura 3D. En la FIG. 3B, el círculo representa la interfaz entre el monómero mostrado y dos otros monómeros (no mostrados) en la HA trimérica. El aminoácido en la posición 223 está localizado en el bucle 220 del dominio de unión a receptores entre la glutamina generalmente presente en la posición 222 y la glicina generalmente presente en la posición 224.

La presente descripción proporciona cambios de la secuencia de aminoácidos de la molécula de hemaglutinina (HA) del virus influenza, que provocan que la molécula de HA sea más antigénica con respecto a anticuerpos específicos para las moléculas de HA que no presentan los cambios. Entre tales cambios de secuencia se incluyen sustituciones y deleciones. La HA resultante se denomina "HA de antigenicidad incrementada".

La molécula de HA de antigenicidad incrementada resulta útil en el ensayo de la eficacia vacunal, ya que el cambio incrementa la sensibilidad de los ensayos diagnósticos para anticuerpos contra virus influenza en el suero. En una realización específica, el virus es un virus influenza A. En una realización alternativa, el virus también puede ser un virus influenza B y en todavía otra realización, puede ser un virus influenza C. En una realización en la que la influenza es un virus influenza A, puede ser un virus influenza A de subtipo H5. En una realización más específica, la molécula de HA de subtipo H5 se modifica para incluir el aminoácido asparagina en la posición 22 (N<sub>223</sub>), dando como resultado una reactividad incrementada con antisueros obtenidos a partir de un animal expuesto a un virus influenza de subtipo H5. En una realización específica, la molécula de HA de la descripción no es una molécula de A/HK/213/03, que es un subtipo H5 natural con la asparagina en la posición 223. El virus influenza puede ser un virus influenza A humano del subtipo H5, incluyendo el virus A/Vietnam/1203/04 (H5N1).

Pueden realizarse cambios de aminoácidos en el dominio de unión a receptores de HA que provocan que la molécula de HA sea más antigénica, p.ej. como se ilustra en la figura 3A, particularmente en la región de bucle 220 en el dominio de unión a receptores. Dicho cambio puede reducir la unión de HA a receptores de ácido siálico sobre los glóbulos rojos, incrementando de esta manera la capacidad de los anticuerpos anti-HA de inhibir la hemaglutinación, dando como resultado la amplificación del efecto de la actividad de unión de anticuerpos en un ensayo de inhibición de la hemaglutinación. Alternativamente, puede realizarse un cambio de aminoácido que provoca que la molécula de HA sea más antigénica a fin de alterar o deleccionar un sitio de glucosilación en la proteína HA, particularmente un sitio de glucosilación que enmascara epítopos sobre HA reconocidos por anticuerpos específicos de HA. En todavía otra

realización, el cambio de aminoácido puede realizarse en un residuo aminoácido correspondiente al residuo 223 del subtipo H5 de HA. En todas las realizaciones de la descripción, pueden identificarse fácilmente modificaciones de aminoácidos que provocan que la molécula de HA sea más antigénica, mediante inmunoensayos que utilizan anticuerpos específicos para el subtipo particular de HA. Una modificación que provoque que la molécula de HA sea más antigénica dará como resultado un título aparentemente más elevado de actividad de unión de anticuerpos, respecto a la actividad de unión con la molécula de HA contra la que se indujeron los anticuerpos. Entre tales ensayos se incluyen ensayos de inhibición de la hemaglutinina (HI).

En una realización específica, la sustitución en una molécula de HA de subtipo H5 de un residuo de serina (que puede ser un residuo glucosilado) por asparagina (que se encuentra no glucosilado o glucosilado de manera diferente) da como resultado una antigenicidad incrementada. Sin embargo, otras sustituciones también pueden dar como resultado una antigenicidad aparentemente incrementada. Tales sustituciones pueden ser, aunque ello no resulta necesario, conservadoras, como treonina por serina o glutamina por asparagina. Pueden conservar la polaridad relativa, como asparagina por serina, o lisina por ácido aspártico, que conserva la polaridad sin mantener el mismo cambio. También se encuentra contemplado sustituir con residuos tales como glicina y alanina que eliminan una cadena lateral reactiva sin presentar un gran efecto sobre la estructura del polipéptido. Finalmente, resultan posibles cambios completamente no conservadores. Nuevamente, inmunoensayos simples indican si un cambio particular da como resultado una antigenicidad incrementada.

Algunos virus H5N1 aviares aislados en Centroamérica y Sudamérica presentan un aminoácido básico, la arginina, en la posición 223. El aminoácido neutro asparagina en la posición 223 se encuentra en la HA del aislado humano A/HK/213/03. Dicho residuo aminoácido está localizado en el bucle 220 del dominio de unión a receptores 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 de receptores. En efecto, la glutamina generalmente presente en la posición 222 y la glicina generalmente presente en la posición 224 se unen directamente al receptor de ácido siálico. Los aminoácidos en el bucle 220 o contiguos al mismo son importantes para la conformación del bolsillo de unión a receptores (Ha et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2001, 98:11181). Aunque la presente descripción no se basa en ninguna explicación particular del efecto observado, resulta posible que la sustitución de la asparagina por la serina en la posición 223 de H5 dé como resultado cambios conformacionales y una especificidad de receptores alterada.

En un aspecto adicional, las moléculas de HA modificadas de acuerdo con la descripción para ser más antigénicas son también más inmunogénicas. Tales moléculas pueden inducir una respuesta inmunológica más fuerte o más potente como componente de una vacuna de la influenza, que a su vez da como resultado una mayor protección contra la infección por influenza.

Los virus influenza originados en reservorios aviares son especialmente preocupantes para la salud pública. Se cree que estos virus es particularmente probable que causen brotes pandémicos de influenza en el ser humano. Por lo tanto, una molécula de HA de un subtipo aviar con antigenicidad y/o inmunogenicidad incrementada puede resultar particularmente útil en inmunoensayos realizados durante el desarrollo de una vacuna. La estrategia ejemplificada en la presente memoria con respecto a H5 resulta útil para incrementar los títulos de ensayo de HI (inhibición de hemaglutinina) frente a otros subtipos de HA y ello resulta particularmente útil para evaluar la inmunidad frente a la influenza aviar. En algunas realizaciones, la molécula de HA con sustitución de aminoácido en el sitio de unión a receptores puede derivarse de un virus de influenza aviar, incluyendo los subtipos H1 a H6, ambos inclusive.

Un aspecto de la presente descripción incluye el uso de virus influenza recombinante que presenta una molécula de HA de antigenicidad incrementada como virus de referencia en un inmunoensayo, en particular un ensayo de HI, incluyendo un kit para realizar dicho ensayo. Por ejemplo, la sustitución de aminoácido de la asparagina en la posición 223 en la molécula de HA H5 incrementa la unión a receptores de ácido siálico de glóbulos rojos (GR) con un enlace alfa 2,6, como la del pollo, aunque una unión reducida a receptores con un enlace alfa 2,3 a ácido N-glucosil-siálico, como la del caballo. Por tanto, un aspecto de la descripción proporciona que la unión más baja resultante en GR de caballo requeriría una menor cantidad de anticuerpo para inhibir la hemaglutinación. Este concepto de introducción de sustituciones de aminoácidos que incrementa la antigenicidad, medida por la unión de anticuerpos, puede aplicarse a la totalidad de 16 subtipos de HA, entre ellos los de los virus influenza A aviares.

La descripción incluye métodos para determinar la eficacia de una vacuna de virus influenza en un animal. Este método implica hacer reaccionar antisueros obtenidos a partir del animal vacunado con un virus influenza que presenta molécula de hemaglutinina (HA) de antigenicidad incrementada. Entre algunos aspectos de métodos para determinar la eficacia de una vacuna de virus influenza en un animal, como se demuestra en los ejemplos, se incluyen hacer reaccionar antisueros obtenidos a partir del animal vacunado con una molécula de HA de subtipo H5 de virus influenza que contiene el aminoácido asparagina en la posición 223 (N<sub>223</sub>), p.ej., la molécula de HA del aislado de H5N1 humano A/HK/213/03. La asparagina en la posición 223 da como resultado una reactividad incrementada con antisueros obtenidos a partir de un animal expuesto a un virus influenza H5 diferente. El animal vacunado puede ser cualquiera de entre varias especies, entre ellas hurones y seres humanos.

También incluidos en la presente descripción se encuentran métodos para incrementar la sensibilidad de un ensayo de HI mediante la utilización de un virus de referencia que incluye una molécula de HA de antigenicidad incrementada.

En algunas realizaciones, tales como, en el caso de que la molécula de HA se origine de un aislado de H5N1 humano de la cepa A/HK/213/03, el cambio de aminoácido es la presencia de una asparagina en la posición 223, dando como resultado una reactividad incrementada con antisueros obtenidos a partir de un animal expuesto a un virus influenza H5 con un residuo aminoácido diferente en esa posición, como A/Vietnam/1203/04. Esta reactividad incrementada puede ser de cualquier nivel, incluyendo un incremento de por lo menos 2 veces o de por lo menos 4 veces de la reactividad. Un incremento de 2 veces o de 4 veces de la sensibilidad podría ser especialmente significativo en situaciones en que los puntos finales de los métodos de titulación convencionales son inferiores al límite de detección.

En una realización específica, la descripción incluye además utilizar como virus de referencia diagnóstico un virus influenza recombinante que incluye una molécula de HA de subtipo H5 modificada con el aminoácido asparagina en la posición 223, dando como resultado una reactividad incrementada con antisueros obtenidos a partir de un animal expuesto a un virus influenza H5. En una realización específica, la molécula HA H5 en el virus de referencia diagnóstico se origina con un aislado de H5N1 humano de cepa A/HK/213/03. En otra realización, se sustituye una asparagina (o glutamato) en la posición 223 de una molécula de H5 de otra cepa de influenza. Resulta fácilmente evidente que puede adaptarse el mismo enfoque a cualquier molécula de HA de cualquier cepa de influenza. En diversas realizaciones, el animal puede ser cualquiera de entre varias especies, entre ellas hurones y seres humanos.

Además de la utilización de virus de referencia con sensibilidad incrementada en ensayos clínicos de vacuna humana, estos virus pueden utilizarse en estudios seroepidemiológicos. Los datos disponibles que muestran cuántos seres humanos han sido infectados por virus H5N1 mediante métodos de detección rápidos y simples como los ensayos de HI, proporcionan información importante sobre la prevalencia de los virus H5N1 en el ser humano. Estos datos pueden utilizarse para evaluar la probabilidad de que los virus H5N1 se propaguen de humano a humano o entre especies de aves y seres humanos.

Entre otros aspectos de la descripción se incluyen métodos para determinar si un animal ha sido expuesto a un virus influenza haciendo reaccionar antisueros obtenidos a partir del animal con un virus de referencia diagnóstico. El virus de referencia diagnóstico se deriva de la misma cepa de virus influenza que el virus de exposición, aunque el virus de referencia contiene una molécula de HA de antigenicidad incrementada. En una realización, el virus de referencia comprende una molécula de HA con una asparagina en la posición correspondiente a la posición 223 en HA H5, en donde la inclusión de asparagina da como resultado una reactividad incrementada con antisueros obtenidos a partir de un animal expuesto a un virus influenza con una molécula de HA de tipo silvestre, dando como resultado una reactividad incrementada con los antisueros. En otra realización, el virus de referencia comprende una molécula de hemaglutinina (HA) de virus influenza que comprende un aminoácido asparagina en la posición correspondiente a la posición 223 en la HA H5, y la molécula de HA no se origina con el aislado de H5 humano A/HK/213/03 y la inclusión de asparagina en la posición 223 da como resultado una reactividad incrementada con antisueros obtenidos a partir de un animal expuesto a un virus influenza. En una realización específica, el virus contraído es un virus H5N1 y el virus de referencia es el aislado de H5N1 humano A/HK/213/03, que incluye la asparagina en la posición del aminoácido 223, dando como resultado una reactividad incrementada con los antisueros específicos de H5N1. En aspectos diferentes de la descripción, el animal puede ser de cualquier especie, incluyendo hurones y seres humanos.

La descripción comprende además vacunas de la influenza que incluyen una molécula de HA de antigenicidad incrementada. En una realización específica, el virus es un aislado de H5N1 humano. En una realización más específica, la HA se deriva de A/HK/213/03. En todavía otra realización, la HA es una H5 modificada para incluir el aminoácido asparagina en la posición 223.

La introducción de modificaciones en la molécula de HA requiere la manipulación al nivel genética, como es bien conocido de la técnica, como se explica en mayor detalle posteriormente. Una vez se ha preparado un gen de HA modificada, se dispone de varios enfoques, tales como los enfoques de "genética inversa", para introducir la molécula de HA modificada en un virus influenza, que entonces puede convertirse en un virus de referencia para evaluar la eficacia de la vacuna, o un virus de referencia diagnóstico para el seguimiento de la epidemia de influenza, que incluye la propagación del virus animal-ser humano y la propagación del virus entre seres humanos.

En algunos aspectos, la descripción incluye virus influenza recombinantes que comprenden una molécula de hemaglutinina (HA) de virus influenza con al menos un cambio de secuencia de aminoácidos que provoca que la molécula de HA sea más antigénica con respecto a anticuerpos específicos para molécula de HA que no presentan los cambios. El cambio de secuencia de aminoácidos puede incluir una sustitución o delección de uno o más aminoácidos. La molécula de HA modificada puede derivarse del virus influenza H5N1 en el fondo genético de un virus influenza A. En algunas realizaciones, el virus influenza A es un virus de cepa maestra. Los virus recombinantes que comprenden una molécula de HA modificada que es más antigénica con respecto a anticuerpos específicos para moléculas de HA que no presentan el cambio de secuencia de aminoácidos pueden utilizarse como un virus de referencia diagnóstico en un ensayo de inhibición de hemaglutinina (HI). El virus recombinante también puede incluirse en un kit de ensayo de inhibición de la hemaglutinina (HI).

En otros aspectos, la descripción incluye métodos de preparación de un virus que comprende una molécula de hemaglutinina (HA). Por ejemplo, un aspecto de la descripción es un método de preparación de un virus que contiene una molécula de hemaglutinina (HA) de virus influenza con al menos un cambio de secuencia de aminoácidos que provoca que la molécula de HA sea más antigénica con respecto a anticuerpos específicos para moléculas de HA que

- no presentan los cambios. El método puede incluir la introducción de un vector recombinante que expresa HA modificada en un sistema de genética inversa. Un método para producir un virus influenza con una molécula de hemaglutinina (HA) puede incluir el cultivo de un sistema de genética inversa en el que el ADN codificante de HA codifica una o más sustituciones de aminoácidos en el sitio de unión a receptores que provoca que la molécula de HA sea más antigénica con respecto a anticuerpos específicos para la molécula de HA que no presenta la sustitución de aminoácido en el sitio de unión a receptores mediante un procedimiento de genética inversa.
- También se encuentran incluidos en la descripción, métodos para preparar ácidos nucleicos codificantes de una molécula de hemaglutinina (HA). La molécula de HA puede contener al menos un cambio de secuencia de aminoácidos que provoca que la molécula de HA sea más antigénica con respecto a anticuerpos específicos para moléculas de HA que no presentan los cambios. En algunas realizaciones, el método comprende introducir una secuencia de nucleótidos en un ácido nucleico codificante de la molécula de HA que no presenta la sustitución de aminoácido en el sitio de unión a receptores, que da como resultado una sustitución de aminoácido en la secuencia de la molécula de HA que provoca que la molécula de HA sea más antigénica con respecto a anticuerpos para la molécula de HA que no presenta la sustitución de aminoácido.
- La expresión “virus influenza” se utiliza en la presente memoria para definir una especie de virus que presenta cepas patogénicas que causan la enfermedad conocida como influenza o gripe.
- La expresión “virus de cepa maestra” se refiere a una cepa vírica en la construcción de cepas de vacuna de crecimiento elevado o atenuadas. Estas cepas maestras aportan típicamente seis segmentos génicos al virus vacunal PB1, PB2, PA, NP, NA, M y NS). El virus de cepa maestra puede ser una cepa que también se utiliza como un componente de vacuna, incluyendo la cepa vírica A/PR/8/34.
- El término “polipéptido” se refiere a un polímero de aminoácidos y no se refiere a una longitud específica del producto; de esta manera, se encuentran incluidos péptidos, oligopéptidos y proteínas dentro de la definición de polipéptido. Este término también no se refiere a, o excluye, modificaciones post-traduccionales del polipéptido, por ejemplo, glucosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones y similares.
- Según se utiliza en la presente memoria, “infeccioso” se refiere a la capacidad de un virus de replicarse en una célula y producir partículas virales. La infectividad puede evaluarse mediante la detección del virus, es decir, la carga viral, o mediante observación del avance de la enfermedad en el animal.
- Un “individuo” o “sujeto” o “animal”, Según se utiliza en la presente memoria, se refiere a vertebrados en los que se produce una infección por virus ARN de cadena negativa, específicamente infección por virus influenza, incluyendo, aunque sin limitación, aves (tales como aves acuáticas y pollos) y miembros de especies de mamífero, tales como especies caninas, felinas, lupinas, mustélidos, roedores (ratas, murinos, etc.), equinas, bovinas, ovinas, caprinas y porcinas, y primates, incluyendo estos últimos los seres humanos. En una realización específica, el sujeto es un hurón, que es un buen modelo animal para el estudio de la influenza. En otra realización, el sujeto es un ser humano.
- Según se utiliza en la presente memoria, el término “inmunogénico” se refiere a que el virus o polipéptido es capaz de inducir una respuesta inmunológica humoral o celular, y preferentemente ambas. Una entidad inmunogénica también es antigénica. Una composición inmunogénica es una composición que induce una respuesta inmunológica humoral o celular, o ambas, al administrarla en un animal.
- Una molécula es “antigénica” en el caso de que sea capaz de interactuar específicamente con una molécula de reconocimiento de antígeno del sistema inmunológico, como una inmunoglobulina (anticuerpo) o receptor de antígeno de célula T. Un polipéptido antigénico contiene un “epítipo” de al menos aproximadamente cinco, y preferiblemente de al menos aproximadamente 10, aminoácidos. Una porción antigénica de un polipéptido, también denominada en la presente memoria “epítipo”, puede ser esa porción que es inmunodominante para el reconocimiento de anticuerpo o receptor de célula T, o puede ser una porción utilizada para generar un anticuerpo de la molécula mediante conjugación de la porción antigénica con un polipéptido portador para la inmunización. Una molécula que es antigénica no necesita ser inmunogénica por sí misma, es decir, capaz de inducir una respuesta inmunológica sin un portador.
- Según se utiliza en la presente memoria, la expresión “sustitución de aminoácido” se refiere a la presencia de un aminoácido en una posición particular en la secuencia de aminoácidos de esa molécula. La sustitución de aminoácido se produce respecto a cualquier otro aminoácido que podría haber ocupado esa posición. El polipéptido que resulta del cambio de secuencia de aminoácidos puede incluir cambios en modificaciones post-traduccionales, como glucosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones o cualesquiera otras modificaciones de aminoácido, así como la sustitución de aminoácidos.
- La expresión “sistema de genética inversa” Según se utiliza en la presente memoria se refiere a métodos de generación de partículas virales, polipéptidos, viriones o ácidos nucleicos de influenza mediante métodos de ingeniería genética. Entre estos métodos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el “sistema plasmídico”, como se describe en Hoffmann (Hoffmann et al., Vaccine 2002, 20:3165; publicación de patente US nº2002/0164770A1, 7 de noviembre, 2002). En términos generales, los sistemas de genética inversa permiten la creación de partículas, polipéptidos y/o ácidos nucleicos de virus con secuencias específicas mediante métodos de ingeniería genética conocidos por el experto en la materia. Estos sistemas también se describen en mayor detalle posteriormente.

Según se utiliza en la presente memoria, la expresión “sitio de unión a receptores” se refiere a la porción de la molécula de HA donde se une el receptor de interés, como el receptor de ácido siálico sobre un glóbulo rojo. La estructura de la molécula de H5 de A/duck/Singapore y la posición del sitio de unión a receptores para la hemaglutinina del subtipo H5 es conocida y ha sido descrita (Ha et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2001, 98:11181). El modelo molecular de esta HA H5, incluyendo el sitio de unión a receptores, se muestra en la fig. 3.

La expresión “virus de referencia diagnóstico” se refiere a un virus con antigenicidad de la HA potenciada. Dicho virus de referencia diagnóstico puede utilizarse en un inmunoensayo, p.ej., el ensayo de inhibición de hemaglutinina.

La expresión “virus de exposición” se refiere a un virus al que ha sido expuesto un animal individual. Esta exposición puede producirse durante el curso de actividades diarias, tales como el contacto con un sujeto infectado, p.ej. que conduce a la exposición de un ser humano a un virus influenza infeccioso. La exposición también puede deberse a un reto clínico específico, como en una situación de ensayo de laboratorio donde un animal de laboratorio, como un hurón, se expone intencionadamente a un virus. Dicha exposición puede generarse expresamente mediante inmunización con una vacuna de la influenza.

La expresión “farmacéuticamente aceptable” se refiere a entidades y composiciones moleculares que son fisiológicamente tolerables y no producen típicamente una reacción alérgica o u otro tipo de reacción adversa similar, como molestia gástrica, mareo y similar, al administrarlas en un paciente. Preferiblemente, Según se utiliza en la presente memoria, la expresión “farmacéuticamente aceptable” se refiere a autorizado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o listada en la Farmacopea US u otra farmacopea generalmente reconocida para la utilización en animales, y más particularmente en seres humanos.

El término “vehículo” se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el compuesto. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, como agua y aceites, incluyendo los originados en petróleo, y de origen animal, vegetal o sintético, como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Las soluciones salinas de agua o de solución acuosa y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol se emplean preferentemente como portadores, particularmente para soluciones inyectables. Los portadores farmacéuticos adecuados se describen en “Remington's Pharmaceutical Sciences”, de E.W. Martin, 18a edición.

Según se utiliza en la presente memoria, el término “adyuvante” se refiere a un compuesto o mezcla que potencia la respuesta inmunológica a un antígeno. Un adyuvante puede servir como depósito de tejido que libera lentamente el antígeno y también un activador del sistema linfóide que potencia no específicamente la respuesta inmunológica (Hood et al., Immunology, segunda ed., Menlo Park, CA: Benjamin/Cummings, 1984, página 384). Con frecuencia, un reto primario con un antígeno solo, en ausencia de un adyuvante, no conseguirá inducir una respuesta inmunológica humoral o celular. Entre los adyuvantes se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, adyuvante de Freund completo, adyuvante de Freund incompleto, saponina, geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias activas en superficie tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, aceite o emulsiones de hidrocarburo, hemocianinas de lapa americana, y adyuvantes humanos potencialmente útiles, como N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-nor-muramil-L-alanil-D-isoglutamina, N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1',2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina, BCG (bacilo de Calmette-Guérin) y *Corynebacterium parvum*. Preferiblemente, el adyuvante es farmacéuticamente aceptable.

Según se utiliza en la presente memoria, el término “aislado” se refiere a que el material referenciado se extrae de su medio nativo, p.ej., una célula o virus. Por tanto, un material biológico aislado puede encontrarse libre de algunos o todos los componentes celulares, es decir, componentes de las células en las que se encuentra naturalmente el material nativo (p.ej., un componente citoplasmático o membranal). Se considerará que un material está aislado en el caso de que se encuentre presente en un extracto celular o sobrenadante. En el caso de moléculas de ácido nucleico, un ácido nucleico aislado incluye un producto de PCR, un ARNm aislado, un ADNc o un fragmento de restricción. En otra realización, un ácido nucleico aislado preferentemente se extrae del cromosoma en el que puede encontrarse, y más preferiblemente ya no se encuentra unido o no se encuentra próximo a regiones no codificantes (aunque puede unirse a sus regiones reguladoras nativas o porciones de las mismas) o a otros genes, situados cadena arriba o cadena abajo del gen contenido en la molécula de ácido nucleico aislada en el caso de encontrarse en el cromosoma. En todavía otra realización, el ácido nucleico aislado no presenta uno o más intrones. Entre las moléculas de ácido nucleico aisladas se incluyen secuencias insertadas en plásmidos, cósmidos, cromosomas artificiales y similares, es decir, cuando forma parte de un constructo de ácido nucleico recombinante quimérico. Por tanto, en una realización específica, un ácido nucleico recombinante es un ácido nucleico aislado. Una proteína aislada puede estar asociada a otras proteínas o ácidos nucleicos, o ambos, con los que se asocia en la célula, o con membranas celulares en caso de que sea una proteína asociada a membrana. Un orgánulo, célula o tejido aislado se extrae del sitio anatómico en el que se encuentra en un organismo. Un material aislado puede purificarse, aunque ello no resulta necesario.

El término “purificado” Según se utiliza en la presente memoria se refiere a material que ha sido aislado bajo condiciones que reducen o eliminan la presencia de materiales no relacionados, es decir, contaminantes, incluyendo materiales nativos a partir de los cuales se obtiene el material. Por ejemplo, un virión purificado se encuentra preferiblemente sustancialmente libre de componentes de célula anfitriona o de cultivo, entre ellos proteínas de cultivo de tejidos o de huevo, patógenos no específicos, y similares. Según se utiliza en la presente memoria, la expresión “sustancialmente libre” se utiliza operativamente en el contexto del ensayo analítico del material. Preferiblemente, el

material purificado sustancialmente libre de contaminantes es al menos 50% puro, más preferentemente al menos 90% puro y más preferiblemente todavía al menos 99% puro. La pureza puede evaluarse mediante cromatografía, electroforesis en gel, inmunoensayo, análisis de composición, ensayo biológico y otros métodos conocidos de la técnica.

- 5 Los métodos para la purificación son bien conocidos de la técnica. Las partículas virales pueden purificarse mediante ultrafiltración o ultracentrifugación, preferiblemente centrifugación continua (véase Furminger, *supra*). Otros métodos de purificación son posibles y se encuentran contemplados en la presente memoria. Un material purificado puede contener menos de aproximadamente 50%, preferiblemente menos de aproximadamente 75%, y lo más preferiblemente menos de aproximadamente 90% de los componentes celulares, medios, proteínas u otros componentes no deseables o impurezas (según requiera el contexto), con los que se encontraba asociado originalmente. La expresión "sustancialmente puro" indica el grado más alto de pureza que puede conseguirse utilizando técnicas de purificación convencionales conocidas de la técnica.

- 15 En una realización específica, el término "aproximadamente" se refiere a dentro de un intervalo estadísticamente significativo de valores. Dicho intervalo puede encontrarse dentro de un orden de magnitud, preferiblemente dentro de 50%, más preferiblemente dentro de 20%, más preferiblemente todavía dentro de 10%, y todavía más preferiblemente dentro de 5% de un valor o intervalo dado. La variación permisible comprendida en el término "aproximadamente" depende del sistema particular a estudio, y podrá ser fácilmente apreciada por el experto en la materia.

#### Hemaglutinina

- 20 La hemaglutinina (HA) es la glucoproteína de cubierta principal de los virus influenza A y B. La hemaglutinina-esterasa (HE) de los virus influenza C es el homólogo de HA en estos virus. Nuevos subtipos de moléculas de HA, típicamente introducidos a partir de aves acuáticas, que es conocido que son reservorios naturales de los virus influenza, resultan en una pandemia de influenza (véase Suzuki y Nei, *Mol. Biol. Evol.* 2002, 19(4): 501-509).

- 25 La HA contiene dos cadenas polipeptídicas: HA1 y HA2, codificadas por un único gen y derivadas de la proteólisis de una única molécula precursora, que incluye la pérdida de un péptido de señal (Suzuki y Nei, *supra*; Air, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, 78(12): 7639-7643). HA1 presenta aproximadamente 320 aminoácidos y es una proteína de unión a receptores y la diana principal de las respuestas inmunológicas. HA2 presenta aproximadamente 220 aminoácidos y proporciona el anclaje a la cubierta viral (Suzuki y Nei, *supra*).

- 30 Los genes de la HA de la influenza A se clasifican en 16 subtipos según sus propiedades antigénicas. Los genes de HA de los virus influenza B y C (HE) no se clasifican en subtipos. Las secuencias de la HA del virus influenza subtipos H1 a H15 y de influenza B y C (HE) se muestran en Suzuki y Nei, *supra*, figura 1. Una comparación de las secuencias de la HA de influenza A subtipos H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11 y H12, incluyendo residuos aminoácidos conservados de la totalidad de los doce subtipos, se muestra en la figura 1 de Air, *supra*. Ambas referencias describen las cepas a partir de las que se han obtenido estas secuencias.

- 35 Se crean nuevas moléculas de HA de la descripción mediante la introducción de cambios en la secuencia de aminoácidos de la molécula de HA que dan como resultado una antigenicidad incrementada. El aislamiento de ácido nucleico codificante de tales moléculas de HA es rutinario (ver Air, *supra*), al igual que la modificación del ácido nucleico para introducir cambios en la secuencia de aminoácidos, p.ej. mediante mutagénesis dirigida a sitio.

- 40 En una realización alternativa, las moléculas de HA de una cepa de un subtipo de HA particular ya contienen una secuencia de aminoácidos que incrementa su antigenicidad respecto a moléculas de HA de los mismos subtipos de una cepa diferente, como se ejemplifica en la presente memoria con respecto a A/HK/213/03, en comparación con, p.ej., A/Vietnam/1203/04. En este caso, la cepa de influenza con la molécula de HA más antigénica podría servir como cepa de referencia diagnóstica. En otra realización, pueden introducirse o sustituirse residuos aminoácidos de la HA más antigénica en la secuencia de la molécula de HA menos antigénica para producir una molécula de HA de antigenicidad incrementada.

- 45 Diversos cambios en la secuencia de una molécula de HA pueden dar como resultado una antigenicidad incrementada. Como se ha indicado anteriormente, la cadena HA1, que es el dominio de unión a receptores y la diana principal de respuesta inmunológica, es la cadena en la que pueden introducirse tales cambios. Los cambios pueden incrementar la afinidad del anticuerpo para la molécula de HA, p.ej., mediante la eliminación de un sitio de glucosilación que genera un epitopo, o favoreciendo una conformación con afinidad de unión a anticuerpos potenciada. Alternativamente, el cambio puede resultar en una unión reducida a receptores de HA, p.ej., un receptor de ácido siálico sobre un glóbulo rojo, provocando que los anticuerpos específicos para la molécula de HA sean competidores más eficaces de la reacción de la hemaglutinina. Los diversos inmunoensayos capaces de demostrar estos cambios, entre ellos el ensayo de inhibición de la hemaglutinina (HI), son bien conocidos de la técnica.

- 55 El ensayo de HI implica partículas de virus influenza completas, al igual que las vacunas actuales. Por tanto, la descripción proporciona virus influenza con moléculas de HA de antigenicidad incrementada. Tales virus se generan más convenientemente mediante un enfoque de "genética inversa", aunque también resulta posible utilizar la reorganización clásica.

## Métodos de genética inversa

Los sistemas de genética inversa desarrollados recientemente han permitido manipular el genoma del virus influenza (Palese et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996, 93:11354; Neumann y 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; solicitud de patente US nº 20040029251). Por ejemplo, se ha demostrado que la expresión controlada por plásmido de ocho ARNs de influenza a partir de un promotor pol I y todos los ARNm a partir de un promotor polII dan como resultado la formación de virus influenza A infeccioso (Hoffmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2000, 97:6108; publicación de patente US nº 20020164770, que da a conocer una descripción de un sistema de genética inversa plasmídico mínimo y una descripción de métodos de ingeniería genética). Estos métodos recombinantes permiten la producción específica de tipos de virus influenza con alteraciones específicas en las secuencias de aminoácidos del polipéptido. Una molécula de HA que contiene una sustitución deseada puede ser parte de un virus influenza recombinante. El virus influenza recombinante puede generarse mediante cualesquiera medios conocidos por el experto en la materia, incluyendo mediante un método de ingeniería genética, como el sistema de "plásmido único" (Hoffmann et al., Vaccine 2002, 20:3165). El virus influenza recombinante puede derivarse de un virus H5N1. El virus recombinante puede presentar el fondo genético de un virus H1N1 utilizado en el desarrollo vacunal, como el virus A/PR/8/34 o cualquier virus influenza A, incluyendo cepas adaptadas al frío de A/Leningrad/134/17/57, A/Leningrad/134/47/57 y A/AnnArbor/6/60. El ácido nucleico correspondiente a la secuencia de la molécula de HA puede aislarse del virus y secuenciarse.

Las técnicas de aislamiento y modificación de ácidos nucleicos y proteínas específicos son bien conocidas por el experto en la materia. Según la presente descripción pueden utilizarse técnicas convencionales de biología molecular, microbiología y ADN recombinante dentro de los conocimientos del estado de la técnica. Tales técnicas se explican por completo en la literatura. Ver, p.ej., Sambrook, Fritsch y Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 (en la presente memoria "Sambrook et al., 1989"); DNA Cloning: A Practical Approach, volúmenes I y II (D.N. Glover ed. 1985); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait ed. 1984); Nucleic Acid Hybridization [B.D. Hames y S.J. Higgins eds. (1985)]; Transcription And Translation [B.D. Hames y 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. (editores). Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc., 1994. Entre estas técnicas se incluyen la mutagénesis dirigida a sitio que utiliza oligonucleótidos con nucleótidos alterados para generar productos de PCR con mutaciones (p.ej., el kit "Quikchange" fabricado por Stratagene).

## Inmunoensayos

Pueden utilizarse diversos medios conocidos de la técnica para detectar la unión inmuno-específica de un anticuerpo a un antígeno para detectar la unión y antigenicidad incrementada según la presente descripción. Un método precoz de detección de la interacción entre un antígeno y un anticuerpo implica la detección y análisis del complejo mediante la precipitación en geles. Un método adicional de detección de una pareja de unión de analito-anticuerpo detector incluye la utilización de anticuerpos detectores radioyodados o una proteína radioyodada que se reactiva con IgG, como la proteína A. Estos primeros métodos son bien conocidos por el experto en la materia, como la revisión en Methods in Enzymology 1980, 70:166-198.

Entre métodos posteriores de determinación de la presencia de un analito en una muestra utilizando únicamente un anticuerpo se incluyen los ensayos de unión competitiva. En esta técnica, el anticuerpo, que con frecuencia se inmoviliza sobre un soporte sólido, se expone a una muestra que se sospecha que contiene el analito junto con una cantidad conocida de analito marcado. Los dos analitos, el analito marcado y el analito en la muestra, entonces competirían para los sitios de unión en el anticuerpo. Se determina el analito marcado libre o el analito marcado unido y a partir de esta medición, se conoce la cantidad de analito competitivo en la muestra. Una descripción más completa de este método se da a conocer en "Basic Principles of Antigen-Antibody Reaction" (Labat, Methods in Enzymology, 70, 3-70, 1980). En el presente ejemplo, el analito marcado puede marcarse con un radioisótopo o con un marcaje enzimático.

Muchos inmunoensayos actuales utilizan un método de doble anticuerpo para detectar la presencia de un analito. Estas técnicas también se revisan en el volumen anteriormente referenciado de Methods in Enzymology. Por tanto, según una realización de la presente descripción, la presencia de los marcadores individuales se determina utilizando una pareja de anticuerpos para cada uno de los marcadores que deben detectarse. Uno de dichas parejas de anticuerpos se denomina en la presente memoria "anticuerpo detector" y el otro de dicha pareja de anticuerpos se denomina en la presente memoria "anticuerpo de captura". Una realización de la presente descripción utiliza por tanto el método de sándwich de doble anticuerpo para detectar un analito en una muestra de líquido biológico. En este método, el analito se interpone entre el anticuerpo detector y el anticuerpo de captura, inmovilizando irreversiblemente el anticuerpo de captura sobre un soporte sólido. El anticuerpo detector contendría un marcaje detectable, con el fin de identificar la presencia del sándwich de anticuerpo-analito y, por tanto, la presencia del analito.

Entre las primeras formas comunes de soportes sólidos se incluyen placas, tubos o perlas de poliestireno, la totalidad de las cuales es bien conocida en el campo del radioinmunoensayo y el inmunoensayo enzimático. Más recientemente, se han utilizado como soportes sólidos varios materiales porosos, tales como nilón, nitrocelulosa, acetato de celulosa, fibras de vidrio y otros polímeros porosos.

Pueden utilizarse diversas técnicas y los dispositivos sensores correspondientes. Entre los aparatos de ensayo automatizados se incluyen los aparatos de ensayo continuos/de acceso aleatorio. Entre los ejemplos de tales sistemas se incluyen PB Diagnostic System, Inc. y el analizador IMX™ presentado por Abbott Laboratories of North Chicago, Ill. Los instrumentos de ensayo automatizados de PB Diagnostic Systems, Inc. se describen en las patentes US nº 5.051.237, nº 5.138.868, nº 5.141.871 y nº 5.147.609.

Son clases adicionales de sistemas analizadores inmunoquímicos, que pueden utilizarse en la práctica de la presente descripción, sistemas inmunosensores ópticos. En general, un inmunosensor óptico es un dispositivo que utiliza principios ópticos cuantitativamente para convertir concentraciones o actividades químicas o bioquímicas de interés en señales eléctricas. Estos sistemas pueden agruparse en cuatro categorías principales: técnicas de reflexión, resonancia del plasmón superficial, técnicas de fibra óptica y dispositivos ópticos integrados. Entre las técnicas de reflexión se incluyen la elipsometría, la espectroscopía por reflexión integral múltiple y los dispositivos de llenado capilar fluorescente. Entre las técnicas de fibra óptica se incluyen la fluorescencia de campo evanescente, el tubo capilar de fibra óptica y los sensores de fluorescencia de fibra óptica. Entre los dispositivos ópticos integrados se incluyen la fluorescencia de campo evanescente plano, el inmunosensor acoplador de gradación de entrada, interferómetro de Mach-Zehnder, interferómetro de Hartman y sensores de interferometría diferencial. La detección holográfica de las reacciones de unión se lleva a cabo mediante detección de la presencia de una imagen holográfica que se genera en una posición de imagen predeterminada cuando un reactivo de una pareja de unión se une a un segundo reactivo inmovilizado de la pareja de unión (ver la patente US nº 5.352.582, publicada el 4 de oct., 1994, de Lichtenwalter et al.). Se describen ejemplos de inmunosensores ópticos en general en un artículo de revisión de G.A. Robins, *Advances in Biosensors* 1991, 1:229-256. Se encuentran descripciones más específicas de estos dispositivos en, por ejemplo, las patentes US nº 4.810.685, nº 4.978.503 y nº 5.186.897; R.A. Brady et al. (*Phil. Trans. R. Soc. Land. B.* 1987, 316:143-160) y G. A. Robinson et al. (en: *Sensors and Actuators*, Elsevier 1992).

Los ensayos serológicos se utilizan ampliamente en la determinación del diagnóstico de influenza, así como en estudios de investigación referidos a la epidemiología y antigenicidad de las cepas virales. En particular, el ensayo de inhibición de hemaglutinina (HI) se utiliza ampliamente debido a sus mínimos requisitos de laboratorio y facilidad de uso. Se encuentra contemplado que la descripción mejorará la aplicabilidad del ensayo de HI mediante el incremento de su sensibilidad. El ensayo de HI puede utilizarse además para demostrar la antigenicidad de la molécula de HA modificada y para ayudar en la caracterización de la molécula de HA modificada como más o menos antigénica que las moléculas no modificadas.

El ensayo de HI determina la capacidad de los anticuerpos de una muestra de suero de unirse a una referencia estandarizada. En el ensayo de HI, se mezclaron diluciones en serie (titulaciones) con cantidades estándares de eritrocitos y se detectó visualmente su asociación formando complejos. El nivel más bajo de suero titulado que daba como resultado un complejo visible era el resultado del ensayo.

Según se ha indicado anteriormente, la presente descripción proporciona una producción y validación mejoradas de vacunas para el tratamiento o prevención de las infecciones por virus influenza. En particular, la presente descripción es aplicable a vacunas preparadas utilizando técnicas de genética inversa. Se encuentra contemplado que la descripción se utilice en la validación y verificación de la respuesta inmunológica después de la vacunación. En particular, aunque no exclusivamente, la descripción proporciona la detección potenciada de anticuerpos después de la exposición de un individuo a un virus influenza debido a la antigenicidad potenciada de la molécula de HA modificada. Esta antigenicidad potenciada se refleja en la sensibilidad incrementada del ensayo utilizado para detectar la respuesta inmunológica, como el ensayo de HI.

#### Desarrollo de vacunas

Según se ejemplifica posteriormente, un virus modificado que contiene una molécula de HA de antigenicidad incrementada es más inmunogénico, lo que a su vez proporciona una respuesta inmunológica más fuerte y un mejor potencial de vacuna.

Entre las estrategias para potenciar la eficacia de la vacuna de influenza se incluyen la utilización de adyuvantes (Wood y Williams, *supra*), la coadministración de moléculas inmunoestimuladoras (Salgaller y Lodge, *J. Surg. Oncol.* 1998, 68:122) y las estrategias de vacunación mucosal. Entre las estrategias de inmunización mucosal se incluyen encapsular el virus en microcápsulas (patentes US nº 5.075.109, nº 5.820.883 y nº 5.853.763) y la utilización de un portador membranoso inmunopotenciador (documento nº WO 98/0558). Además, la inmunogenicidad de los inmunógenos administrados por vía oral puede potenciarse mediante la utilización de glóbulos rojos (GR) o fantasmas de GR (patente US nº 5.643.577) o mediante la utilización de antígeno de lengua azul (patente US nº 5.690.938). Aunque estos enfoques son prometedores como estrategias futuras de vacunación mejorada, su utilización en situaciones específicas requiere la validación y vigilancia para garantizar la eficacia de la vacuna. Se encuentra contemplado que la descripción descrita en la presente memoria potencie estas estrategias, incluyendo el incremento de la capacidad de detectar sus efectos inmunogénicos.

## Ejemplos

Los ejemplos a continuación ilustran diversos aspectos de la descripción.

### Ejemplo 1: títulos séricos de anticuerpos en hurones inoculados

Se obtuvieron virus H5N1 altamente patogénicos de laboratorios colaboradores de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en Asia. Para comparar la inmunogenicidad de los virus influenza 2003 de genotipo Z, que se volvió dominante en 2004, con la de los virus 2004, los presentes inventores inocularon hurones con el virus H5N1 aislado a partir de un caso humano fatal (A/HK/213/03) (Guan et al., Proc. Para comparar la inmunogenicidad de los virus influenza 2003 de genotipo Z, que se volvió dominante en 2004, con la de los virus 2004, los presentes inventores inocularon hurones con el virus H5N1 aislado de un caso humano fatal (A/HK/213/03) (Guan et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2004, 101:8156) y con cuatro virus H5N1 aislados de seres humanos, pollos y halcones en 2004 (fig. 1A). Los hurones exocriados macho y hembra se obtuvieron a través de un programa de cría especial del Animal Resources Center en St. Jude Children's Research Hospital. Los animales tenían 3-5 meses de edad y eran seronegativos según las pruebas de HI para exposición a los virus influenza A H1N1, H3N2 y H5N1 actualmente circulantes y virus influenza B. Los virus se propagaron en las cavidades alantoicas de huevos de gallina embrionados de 10 días de edad a 35°C durante 48 h. El líquido alantoico recolectado tras un único pase en huevos de gallina embrionados se congeló a -80°C y se utilizó en los experimentos. Los anticuerpos séricos se titularon mediante ensayo de HI con virus de reto 28 días después de la inoculación. Los virus A/HK/213/03 indujeron títulos de anticuerpo elevados (1:640-1:1280), mientras que cuatro cepas de 2004 indujeron títulos de HI muy bajos (1:20-1:40).

Los títulos de HI relativamente bajos de los virus H5N1 2004 podrían haber sido el resultado de supresión inmunológica general inducida por el virus. Sin embargo, los resultados de la vacunación con vacunas de  $\Delta$ H5N1-A/PR/8/34 (6+2) que incluían HA y neuraminidasa de A/HK/213/03 y de A/Vietnam/1203/04 indicó que las diferencias en H5 podrían ser un factor contributivo importante de este efecto (fig. 1B). La vacunación con dos dosis separadas de 7  $\mu$ g de vacuna  $\Delta$ H5N1/03 indujo niveles elevados de anticuerpos séricos detectables en pruebas de neutralización tanto de HI como de virus. Tras una vacunación idéntica con  $\Delta$ H5N1/04, se detectaron títulos muy bajos (aproximadamente 1:20) en la prueba de HI, mientras que los títulos neutralizadores eran mucho más elevados (aproximadamente la mitad de los inducidos por  $\Delta$ H5N1/03). Los estudios anteriores han encontrado que la vacuna inactivada derivada de A/duck/Singapore/3/97 (H5N3) induce poco o nada de anticuerpo sérico detectable (Nicholson et al., Lancet 2001, 357:1937; Stephenson et al., Vaccine 2003, 21:1687). Estos resultados conjuntamente indican que algunos aislados de H5 podrían presentar propiedades inmunogénicas y/o antigénicas no habituales. La alineación de las secuencias de aminoácidos de H5 reveló que las 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 presenta un sitio potencial de glucosilación en la asparagina N<sub>154</sub> (N<sup>154</sup>-S<sup>155</sup>-T<sup>156</sup>, N-X-S/T, X $\neq$  P). La comparación de las secuencias reveló tres aminoácidos (S<sub>120</sub>, K<sub>189</sub>, y S<sub>223</sub>) que se encontraban presentes en todos los virus 2004 pero que no se encontraban presentes en A/HK/213/03. K<sub>212</sub> era característico del virus A/Vietnam/1203/04.

### Ejemplo 2: generación y caracterización antigénica de los virus $\Delta$ H5- A/PR/8/34 recombinantes

Con el fin de someter a ensayo el impacto de los aminoácidos identificados sobre la inmunogenicidad y protección frente al reto vírico, los presentes inventores el sistema de genética inversa de 8 plásmidos para generar virus recombinantes con siete segmentos génicos de A/PR/8/34 y el segmento génico de HA de A/Vietnam/1203/04 que contiene mutaciones puntuales (Hoffmann et al., Vaccine, 2002, 20:3165). Los virus recombinantes convertidos en no patogénicos mediante la modificación de la HA H5 en el sitio de corte se generaron mediante trasfección de ADN (Hoffmann et al., Vaccine 2002, 20:3165). Se insertaron mutaciones puntuales en la HA durante la PCR mediante la utilización del kit de mutagénesis dirigida a sitio QuikChange® (Stratagene, Cedar Creek, TX, EE.UU.) y un juego de cebadores específicos de HA H5. Virus reagrupados contenían el gen de HA o los genes de HA y neuraminidasa (NA) de virus H5N1 en el fondo genético de virus A/PR/8/34 (H1N1) (ver la Tabla 1a para virus generados para el presente estudio y sus nombres abreviados). El líquido alantoico recolectado tras un único pase en huevos de gallina embrionados se congeló a -80°C y se utilizó en experimentos. Los genes de HA de los virus recombinantes se amplificaron mediante RT-PCR y se secuenciaron para verificar que sólo se encontraban presentes las mutaciones designadas. El cambio de aminoácido se verificó mediante secuenciación del segmento HA de los virus recombinantes (Tabla 1a).

Con el fin de evaluar las propiedades antigénicas y la diversidad de las HA recombinantes, los presentes inventores llevaron a cabo ensayos de HI con un panel de seis anticuerpos monoclonales anti-HA (Tabla 2). Se produjeron los anticuerpos monoclonales (mAb) CP24, CP46, CP58 y 406/7 de la HA del virus A/chicken/Pennsylvania/1370/83 (H5N3) en el Departamento de enfermedades infecciosas del St. Jude Children's Research Hospital. El mAb VN04-6 de la HA del virus A/Vietnam/1203/04 y el mAb HK03-3 de la HA del virus A/HK/213/03 se prepararon mediante una modificación del método descrito por Kohler y Milstein (Kaverin et al., Journal of Virology 2004, 78:240; Koher et al., European Journal of Immunology 1976, 6:511). Cinco mAb reaccionaron a títulos relativamente elevados con el virus  $\Delta$ H5N1/03, pero sólo 3 reaccionaron con la HA de  $\Delta$ H5/04. Los patrones de reactividad de los virus  $\Delta$ H5<sub>S155→N</sub>,  $\Delta$ H5<sub>T156→A</sub>/04,  $\Delta$ H5<sub>S120→N</sub>/04 y  $\Delta$ H5<sub>R212→K</sub>/04 eran similares, en general, al del virus  $\Delta$ H5/04. Las reacciones del virus  $\Delta$ H5<sub>S120→N</sub>,  $\Delta$ H5<sub>S155→N</sub>,  $\Delta$ H5<sub>T156→A</sub>/04 eran similares a las del virus  $\Delta$ H5N1/03. Cuatro mAb reconocieron la HA de  $\Delta$ H5/04 con la mutación  $\Delta$ H5<sub>S223→N</sub> ( $\Delta$ H5<sub>S223→N</sub>/04). La mutación inversa, N<sub>223</sub>→S en la HA del virus de 2003 ( $\Delta$ H5<sub>N223→S</sub>/03) dio como

resultado títulos de HI significativamente reducidos o la pérdida del reconocimiento por parte de los mAb.

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

Se obtuvo otra observación interesante en una prueba de HI con glóbulos rojos (GR) de pollo y de caballo. Curiosamente, los virus  $\Delta H5_{S223 \rightarrow N}/04$  recombinantes eran menos capaces de aglutinar GR de caballo al 1% pero aglutinaban GR de pollo a un título elevado (1:1024). Ninguno de los virus recombinantes restantes defería en su reacción a los GR de pollo y caballo en la misma medida.

Ejemplo 4: vacunación de hurones con virus recombinantes de H5 mutante

Los presentes inventores evaluaron la inmunogenicidad y eficacia protectora de las vacunas inactivadas por grupos de vacunación de 3 hurones mediante la inyección intramuscular con preparaciones de virus  $\Delta H5N1/04$ ,  $\Delta H5/04$ ,  $\Delta H5_{S155 \rightarrow N, T156 \rightarrow A}/04$ ,  $\Delta H5_{S120 \rightarrow N}/04$  y virus  $\Delta H5_{S223 \rightarrow N}/04$  estandarizado para el contenido de HA. Se utilizó la técnica de inmunodifusión radial única para estandarizar  $\Delta H5N1/03$  (Webby et al., Lancet 2004, 363:1099). Los virus recombinantes restantes se separaron mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 12%; los geles teñidos se analizaron mediante densitometría en un analizador de imágenes luminiscentes FUJIFILM LAS-1000plus y se cuantificó la HA mediante comparación con una preparación de proteína de referencia. Tras recibir dos inyecciones de 7  $\mu$ g de HA, se inoculó cada animal con A/Vietnam/1203/04 (H5N1). Se vacunaron grupos de 3 hurones mediante inyección intramuscular de 250  $\mu$ l de PBS estéril que contenía 7  $\mu$ g de HA procedente de virus purificados inactivados. Los virus de vacuna se inactivaron, se concentraron y se purificaron tal como se ha descrito (Liu et al., Virology 2003, 314:580; Webby et al., Lancet 2004, 363:1099). En tres animales de control se inyectaron 250  $\mu$ l de PBS estéril únicamente. El día 21 después de la vacunación, se recolectó suero y se realizó una segunda inyección intramuscular de 7  $\mu$ g de HA. Dos semanas después, se recolectó nuevamente suero y los animales se inocularon con virus de reto.

Los animales vacunados y de control se inocularon por vía intranasal tal como se ha descrito anteriormente, con  $10^6$  dosis infecciosas en huevo al 50% (EID<sub>50</sub>) de virus A/Vietnam/1203/04 (Govorkova et al., Journal of Virology 2005, 79:2191). Se monitorizaron diariamente durante dos semanas los signos clínicos de infección, el peso corporal y la temperatura. Los hurones que manifestaban signos de enfermedad grave fueron sacrificados. Para estimar la respuesta inmunológica postinfecciosa, se inocularon grupos adicionales de hurones con  $10^6$  EID<sub>50</sub> de los aislados de H5N1 humano y aviar A/HK/213/03, A/Vietnam/3046/04, A/Vietnam/3062/04, A/chicken/Vietnam/39/04 y A/falcon/HK/D0028/04. Se recogieron sueros de los animales el día 28 después de la inoculación. Con el fin de determinar los títulos virales en el tracto respiratorio superior, se obtuvieron especímenes mediante lavado nasal los días 3, 5 y 7 (Govorkova et al., Journal of Virology 2005, 79:2191). Los virus en las muestras se titularon en huevos de gallina embrionados de 10 días de edad y se expresaron como log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub> por cada 0,1 ml. Los lavados nasales de todos los animales vacunados mostraron títulos virales de 2,5-4,5 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub> el día 3, 0,5- 2,5 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub> el día 5, y 0,25 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub> o menos el día 7 (fig. 2). Los hurones no vacunados presentaban un título medio de 4,0 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub> una semana después de la infección. Dos de los 3 hurones de control desarrollaron signos de enfermedad grave (pérdida de peso masiva y parálisis) y fueron eutanizados, y uno murió de infección. Sólo un hurón vacunado enfermó gravemente. Este hurón, vacunado con virus  $\Delta H5_{S120 \rightarrow N}/04$ , mostró signos neurológicos graves y fue eutanizado el día 7 después de la inoculación. Este hurón había mostrado conjuntivitis vírica grave el día 4 después de la inoculación, con la posterior diseminación del virus al cerebro. Es probable que el virus fuese transferido a los ojos durante el lavado nasal el día 3 y que la rápida diseminación neuronal al cerebro causase encefalitis. Los hurones vacunados restantes mostraron actividad reducida, pérdida de peso corporal y temperatura corporal incrementada durante los primeros 3 días después del reto vírico. Estos signos desaparecieron el día 5 y todos los animales se recuperaron rápidamente. Por tanto, todos los virus de vacuna sometidos a ensayo protegieron a los hurones del reto letal por A/Vietnam/1203/04. La vacunación redujo los títulos virales en el tracto respiratorio superior y redujo la duración de la propagación del virus.

Ejemplo 5: pruebas de HI y neutralización de la inmunogenicidad de virus  $\Delta H5-A/PR/8/34$  recombinantes

El suero de los hurones vacunados se sometió a ensayo contra los virus recombinantes en ensayos de HI y neutralización del virus (Tablas 3 y 4, respectivamente). Los sueros recogidos de hurones se trataron durante la noche con enzima destructores de receptores de *Vibrio cholerae* (Denka-Seiken, Tokyo, Japón), inactivados por calor a 56°C durante 30 min y se adsorbieron con una suspensión al 0,5% de eritrocitos de pollo (GRP). Se llevaron a cabo pruebas de HI y neutralización del virus estándares en células MDCK como se ha descrito anteriormente (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).

Se utilizaron cuatro unidades de hemaglutinación (UHA) en cada ensayo de HI y 100 dosis infecciosas de cultivo de tejidos al 50% (TCID<sub>50</sub>) en cada ensayo de neutralización. Los sueros procedentes de hurones vacunados con virus reagrupado de gen único de tipo silvestre (virus de referencia  $\Delta H5/04$ ) produjeron títulos de HI de 1:20. El constructo en el que se había eliminado el sitio de glucosilación ( $\Delta H5_{S155 \rightarrow N, T156 \rightarrow A}/04$ ) indujo títulos de HI de 1:10-1:20.  $\Delta H5_{S120 \rightarrow N}/04$  mutante dio como resultado títulos de HI de 1:20 a 1:80. En contraste, la vacunación con  $\Delta H5_{S223 \rightarrow N}/04$  dio como resultado un título de HI de 1:640, y los otros sueros inmunológicos sometidos a ensayo reaccionaron con el virus  $\Delta H5_{S223 \rightarrow N}/04$  a títulos de HI elevados (1:160 a 1:320). Por tanto, aunque la vacunación indujo inmunidad protectora, los niveles de anticuerpo detectable eran diferentes.

Todos los virus  $\Delta$ H5/04 produjeron títulos elevados de anticuerpos neutralizantes de virus después de la vacunación (1:320 a 1:1280) (Tabla 4). No se observaron diferencias sustanciales entre los títulos de neutralización homólogos y heterólogos. Por tanto, las diferencias observadas entre los antisueros en el reconocimiento de la HA no reflejaban la capacidad de los anticuerpos de neutralizar virus.

#### 5 Ejemplo 6: reactividad de los virus recombinantes

Para evaluar adicionalmente la reactividad de los virus recombinantes, los presentes inventores utilizaron ensayos de HI para someter a ensayo el suero de ratón y pollo hiperinmune obtenido tras la vacunación con los virus  $\Delta$ H5N1/03 y A/HK/213/03 contra los virus recombinantes con HA alteradas (Tabla 5). Los títulos de HI medios contra virus  $\Delta$ H5N1/03 homólogo fueron de 1:2560. Los títulos de HI contra  $\Delta$ H5/04 fueron de 1:160. Los títulos de HI contra virus  $\Delta$ H5<sub>S223→N</sub>/04 recombinante eran al menos dos veces los títulos contra los otros mutantes.

Para obtener información adicional sobre la contribución del aminoácido en la posición 223 a la reactividad serológica, los presentes inventores generaron un virus recombinante en el que H5 se derivaba de A/HK/213/03, con sólo la mutación puntual N<sub>223</sub>→S (Tabla 1a). Este virus  $\Delta$ H5<sub>N223→S</sub>/03 recombinante presentaba títulos de HI más bajos en GR de pollo y de caballo que el virus  $\Delta$ H5N1/03. Para caracterizar adicionalmente el impacto del aminoácido 223 sobre el reconocimiento antígeno-anticuerpo, los presentes inventores generaron virus recombinantes que contenían HA de tipo silvestre y HA con mutación S<sub>223</sub>→N de A/duck/Singapore/3/97 (véase la Tabla 1a). Estos virus se sometieron a ensayo mediante ensayo de HI frente a un panel de antisueros anti-H5 y mAb (Tabla 6). La sustitución S<sub>223</sub>→N en la HA incrementó drásticamente los títulos de HI (en un factor de 4 o superior). Sin embargo, esta mutación no alteró significativamente el patrón de reactividad de la HA de A/duck/Singapore/3/97, especialmente en las reacciones con los mAb: ni la HA original ni la HA mutada reaccionaron con los mAb HK03-3 y CP46 y ambos reaccionaron a un título bajo con CP46 (Tabla 6). Estos resultados demuestran que la sustitución S<sub>223</sub>→N en la HA incrementa la sensibilidad del ensayo de HI.

Ejemplo 7: virus de referencia diagnósticos de segunda generación que se predice que incrementarán la sensibilidad del ensayo de HI

Los presentes inventores han demostrado anteriormente, en el Ejemplo 3, anteriormente, que mediante la conversión del aminoácido en la posición 223 de la HA H5 a asparagina, se incrementa la sensibilidad del ensayo de HI utilizando glóbulos rojos de pollo. Los presentes inventores proporcionan pruebas de que la base molecular de este efecto está causada por una especificidad de receptores alterada. El virus mutante con sensibilidad incrementada no aglutinó los glóbulos rojos de caballo que sólo presentan enlace alfa 2,3. Por tanto, los cambios de aminoácidos que dan como resultado la incapacidad de aglutinar glóbulos rojos de caballo son candidatos con potencial de sensibilidad incrementada en el ensayo de HI utilizando glóbulos rojos de pollo. Este concepto puede aplicarse a la totalidad de los 16 subtipos de HA, especialmente virus influenza A aviares que presentan especificidad 2,3.

Las técnicas de genética inversa permiten la generación de virus recombinantes que presentan cambios menores en sus estructuras antigénicas pero que están 'optimizados' en el reconocimiento de diferentes sustratos celulares. Preferiblemente están mutados los aminoácidos (91, 130-134, 149, 151, 179, 186, 190-191, 220-225 para H5) que se encuentran próximos o son parte del sitio de unión a receptores. Pueden construirse plásmidos con HA de ingeniería genética y pueden generarse virus mediante cotransfección. Los virus recombinantes pueden someterse a ensayo mediante ensayos de HA que utilizan glóbulos rojos de pollo y glóbulos rojos de caballo en paralelo. Los virus candidatos que sí aglutinan glóbulos rojos de pollo pero que no aglutinan glóbulos rojos de caballo, serán candidatos para el ensayo en ensayos de HI. En experimentos complementarios, se generan virus que aglutinan glóbulos rojos de caballo pero no aglutinan glóbulos rojos de pollo. La combinación de candidatos con cambios únicos de aminoácidos puede incrementar adicionalmente la sensibilidad. Se espera que la evaluación de los candidatos conducirá a virus de referencia diagnósticos con reactividad específica con receptores con especificidad 2,3.

Tabla 1a. Virus H5-PR/8/34 recombinantes generados para el uso en el presente estudio.

Virus recombinante:		Posición de aminoácido en HA1											
Nombre completo	Abreviatura*	36	83	86	120	155	189	212	223	263			
A/HK/213/03 ΔHSN1 x PR/8/34	ΔHSN1/03	T	A	A	N	N	A	R	K	N			A
A/Vietnam/1203/04 ΔHSN1 x PR/8/34	ΔHSN1/04	K	T	V	S	S	T	K	R	S			T
A/Vietnam/1203/04 ΔHS x PR/8/34	ΔHS/04	K	T	V	S	S	T	K	R	S			T
A/Vietnam/1203/04 ΔHS <sub>S155-N</sub> , T156-A x PR/8/34	ΔHS <sub>S155-N</sub> , T156-A/04	T	A	V	S	N	A	K	R	S			T
A/Vietnam/1203/04 ΔHS <sub>S120-N</sub> x PR/8/34	ΔHS <sub>S120-N</sub> /04	T	A	V	N	S	T	K	R	S			T
A/Vietnam/1203/04 ΔHS <sub>R212-K</sub> x PR/8/34	ΔHS <sub>R212-K</sub> /04	T	A	V	S	S	T	K	K	S			T
A/Vietnam/1203/04 ΔHS <sub>S223-N</sub> x PR/8/34	ΔHS <sub>S223-N</sub> /04	T	A	A	S	S	T	K	R	N			A
A/Vietnam/1203/04 ΔHS <sub>S120-N</sub> , S155-N, T156-A x PR/8/34	ΔHS <sub>S120-N</sub> , S155-N, T156-A/04	T	A	A	N	N	A	K	R	S			A
A/HK/213/03 ΔHS <sub>N223-S</sub> x PR/8/34	ΔHS <sub>N223-S</sub> /03	T	A	A	N	N	A	R	K	S			A
A/duck/Singapore/3/97 H5 x PR/8/34	H5/97 <sup>†</sup>	T	D	V	S	N	A	K	E	S			A
A/duck/Singapore/3/97 H5 <sub>S223-N</sub> x PR/8/34	H5 <sub>S223-N</sub> /97	T	D	V	S	N	A	K	E	N			A

\*: Δ los aminoácidos multibásicos en H5 se eliminaron mediante ingeniería genética.

<sup>†</sup>: A/duck/Singapore/3/97 de tipo silvestre no presenta aminoácidos multibásicos.

Tabla 1b. Diferencias de secuencia en la proteína HA1 de los virus influenza H5N1

Virus	Posición de aminoácido en HA1										
	36	83	86	120	155	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	

ES 2 728 791 T3

Tabla 2. Análisis de HI de virus ΔH5 recombinantes con anticuerpos monoclonales anti-H5

Virus	Anticuerpos monoclonales de 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 <sub>S155→N, T156→A</sub> /04	3200	<100	800	<100	800	100
ΔH5 <sub>S120→N</sub> /04	12800	200	800	<100	1600	<100
ΔH5 <sub>R212→K</sub> /04	12800	100	1600	<100	6400	<100
ΔH5 <sub>S223→N</sub> /04	51200	3200	12800	<100	25600	<100
ΔH5 <sub>S120→N, S155→N, T156→A</sub> /04	12800	1600	3200	<100	1600	200
ΔH5 <sub>N223→S</sub> /03	12800	800	≤100	<100	200	≤100

Los ensayos de HI se llevaron a cabo en placas de microtitulación con GR de pollo al 0,5%. Los títulos son el recíproco de las diluciones más bajas de mAb que inhibían la hemaglutinina causada por 4 unidades hemaglutinantes (UHA) de virus.

\* mAb anti-HA contra virus A/Vietnam/1203/04,

† mAb anti-HA contra virus A/HK/213/03,

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

Tabla 3. Inmunogenicidad de los virus recombinantes  $\Delta$ Vietnam/1203/04  $\Delta$ H5 HA en hurones

Virus	Título de HI de sueros después de la inmunización con:											
	$\Delta$ H5/04		$\Delta$ H5 <sub>S155→N, T156→A</sub> /04		$\Delta$ H5 <sub>S120→N</sub> /04		$\Delta$ H5 <sub>S223→N</sub> /04					
$\Delta$ H5N1/03	20	20	10	160	80	160	20	20	10	20	10	10
$\Delta$ H5/04	<u>20</u>	<u>20</u>	<u>20</u>	20	20	20	20	20	20	20	20	20
$\Delta$ H5 <sub>S155→N, T156→A</sub> /04				<u>20</u>	<u>10</u>	<u>20</u>						
$\Delta$ H5 <sub>S120→N</sub> /04						<u>80</u>	<u>80</u>	<u>80</u>	<u>20</u>			
$\Delta$ H5 <sub>S223→N</sub> /04	160	320	320	160	320	160	320	320	320	640	640	<u>640</u>

Se vacunaron dos veces a intervalos de 3 semanas hurones seronegativas para influenza de once semanas de edad mediante inyección intramuscular de una preparación de virus inactivados, purificados y concentrados que contenían 7 µg de HA en 250 µl de PBS. Los datos son los títulos de HI procedentes de 3 hurones presentados individualmente. Los ensayos de HI utilizaron GR de pollo al 0,5%.

5

Tabla 4. Títulos de neutralización de virus de sueros de hurones tras la vacunación con virus que contenían la HA modificada de virus A/Vietnam/1203/04.

Virus	Títulos de anticuerpo neutralizante tras la inmunización con:												
	ΔH5N1/04			ΔH5/04			ΔH5 <sub>S155→N, T156→A</sub> /04			ΔH5 <sub>S223→N</sub> /04			simulado
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 <sub>S155→N, T156→A</sub> /04	1280	1280	640	1280	640	640	<u>1280</u>	<u>1280</u>	<u>640</u>	1280	1280	1280	<80
ΔH5 <sub>S223→N</sub> /04	1280	1280	1280	1280	1280	640	1280	1280	320	<u>1280</u>	<u>1280</u>	<u>1280</u>	<80
ΔH5 <sub>S223→N</sub> N1/04	1280	1280	640	1280	640	640	1280	1280	640	1280	1280	1280	<80

10

Se llevó a cabo el ensayo de neutralización en células MDCK. Los títulos son el recíproco de las diluciones más bajas de sueros que inhiben por completo 100 TCID<sub>50</sub> de virus. Los títulos homólogos están subrayados. Los valores son los títulos de neutralización de 3 hurones presentados individualmente.

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

Virus	Antisuero policlonal contra:	
	Vacuna de ΔH5N1/03	A/HK/213/03 (H5N1)
ΔH5N1/03	2560	2560
ΔH5/04	160	160
ΔH5 <sub>S155→N; T156→A</sub>	80	320
ΔH5 <sub>S120→N</sub> /04	320	320
ΔH5 <sub>S223→N</sub> /04	1280	640

El ensayo de HI se llevó a cabo en placas de microtitulación con GR de pollo al 0,5% (Palmer *et al.*, in *US Department of Health, Education and Welfare, Immunology series n° 6. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 1975*). Los títulos son el recíproco de las diluciones más bajas de sueros que inhibían la hemaglutinina causada por 4 UHA de virus.

Tabla 6. Análisis antigénico de los virus H5/97 y H5<sub>S223N</sub>/97 con anticuerpos policlonales y monoclonales.

Virus	Título de HI de antisueros policlonales:						Título de HI de mAb:					
	A/ck/Hidalgo/94	A/HK/156/97	A/Gs/HK/497-4/97	A/ck/HK/YU2/2/02	A/HK/213/03	ΔH5/03	VN04-6*	HK03-3†	CP58‡	CP24‡	CP46‡	CP406/7‡
ΔH5/03	20	320	5120	12800	160	5120	25600	6400	1600	12800	<100	1600
H5/97	40	640	640	320	<10	10	3200	<100	3200	1600	<100	3200
H5 <sub>S223→N</sub> /97	320	10240	10240	2560	80	1280	2600	<100	25600	51200	200	25600

mAb anti-HA contra virus A/Vietnam/1203/04.  
 † mAb anti-HA contra virus A/HK/213/03.  
 ‡ mAb anti-HA contra virus A/chicken/Pennsylvania/1370/83.  
 El ensayo de HI se llevó a cabo en placas de microtitulación con GR de pollo al 0,5% (14). Los títulos son el recíproco de las diluciones más bajas de sueros que inhibían la hemaglutinina causada por 4 UHA de virus.

15

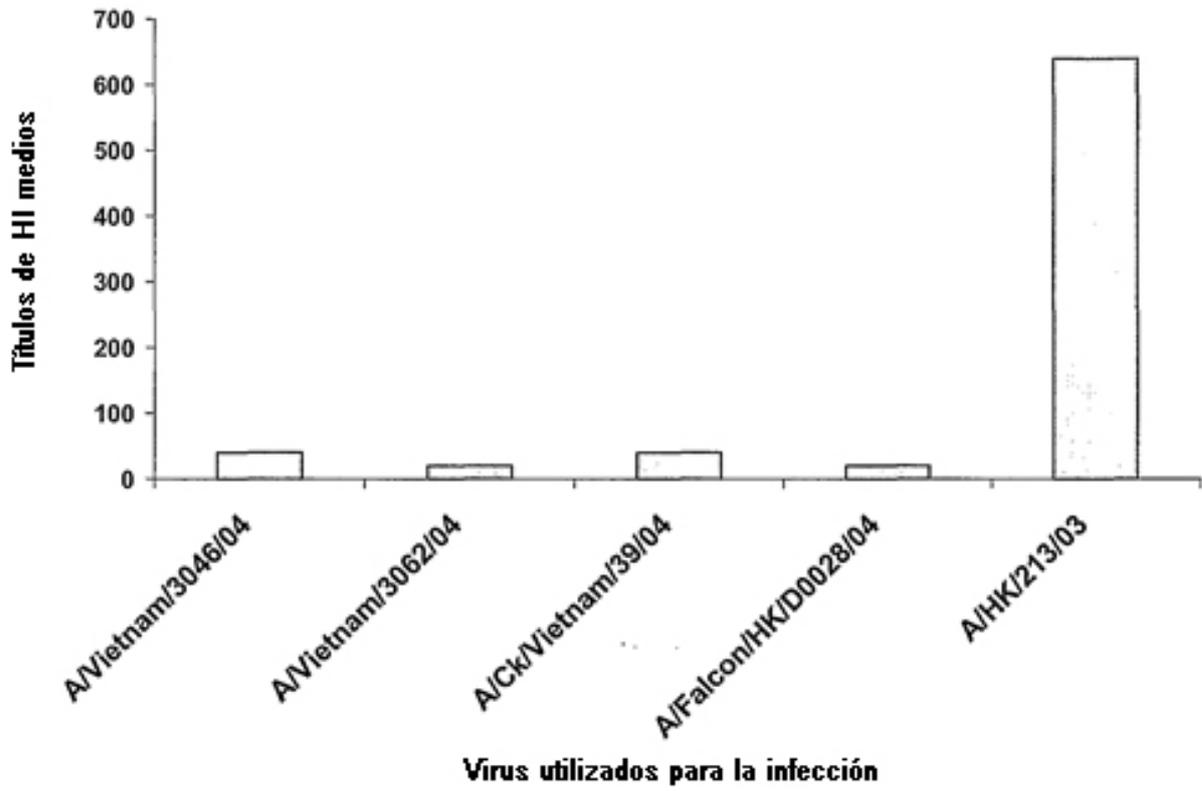
## REIVINDICACIONES

1. Una molécula de hemaglutinina (HA) de virus influenza A H5 que comprende una sustitución de aminoácido en el sitio de unión a receptores, en donde la molécula de HA sustituida comprende el aminoácido asparagina en la posición correspondiente a la posición 223 en la HA H5, en donde la molécula de HA no se origina con el aislado de H5 humano A/HK/213/03 y la inclusión de asparagina en la posición 223 da como resultado una reactividad incrementada con antisueros obtenidos a partir de un animal expuesto a un virus influenza.
2. La molécula de HA de virus influenza A H5 según la reivindicación 1, en donde la sustitución de aminoácido altera un sitio de glucosilación.
3. La molécula de HA de virus influenza A H5 según la reivindicación 1, en donde el virus influenza es un virus influenza A humano.
4. La molécula de HA de virus influenza A H5 según la reivindicación 3, en donde el virus influenza A humano es un miembro del subtipo H5.
5. La molécula de HA de virus influenza A H5 según la reivindicación 3, en donde el virus influenza A humano es el virus A/Vietnam/1203/04 (H5N1).
6. La molécula HA del virus influenza A H5 según la reivindicación 1, que se deriva de un virus de influenza aviar.
7. Un virus influenza recombinante que comprende la molécula HA de virus influenza según la reivindicación 1.
8. El virus influenza recombinante según la reivindicación 7, en donde la molécula de HA de virus influenza se deriva del virus influenza H5N1 en el fondo genético de un virus influenza A.
9. El virus influenza recombinante según la reivindicación 7, en donde el virus se utiliza como virus de referencia diagnóstico en un ensayo de inhibición de hemaglutinina (HI).
10. Un kit de ensayo de inhibición de hemaglutinina (HI) que comprende el virus influenza recombinante según la reivindicación 7.
11. Un método de preparación de un virus influenza que contiene la molécula HA de virus influenza A H5 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, comprendiendo el método la introducción de un vector recombinante que expresa la molécula HA del virus influenza A H5 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en un sistema de genética inversa.
12. Un método *in vitro* para determinar la eficacia de una vacuna de virus influenza en un animal, en donde dicho método *in vitro* comprende hacer reaccionar antisueros obtenidos a partir de un animal vacunado con una molécula de hemaglutinina (HA) de virus influenza A H5 que comprende una sustitución de aminoácido en el sitio de unión a receptores, en donde la molécula de HA sustituida comprende el aminoácido asparagina en la posición correspondiente a la posición 223 en la HA H5, en donde la molécula de HA no se origina con el aislado de H5 humano A/HK/213/03 y la inclusión de asparagina en la posición 223 da como resultado una reactividad incrementada con antisueros obtenidos a partir de un animal expuesto a un virus influenza.
13. Un método para producir un virus influenza que comprende una molécula de hemaglutinina (HA) de virus influenza A H5, comprendiendo el método el cultivo de un sistema de genética inversa en el que ADN codificante de la HA del virus influenza A H5 codifica una sustitución de aminoácido en el sitio de unión a receptores, en donde la molécula de HA sustituida comprende el aminoácido asparagina en la posición correspondiente a la posición 223 en la HA H5, en donde la molécula de HA no se origina con el aislado de H5 humano A/HK/213/03 y la inclusión de asparagina en la posición 223 da como resultado una reactividad incrementada con antisueros obtenidos a partir de un animal expuesto a un virus influenza.
14. Un método para incrementar la sensibilidad de un ensayo de inhibición de la hemaglutinina (HI), comprendiendo el método hacer reaccionar antisueros obtenidos a partir del animal vacunado o infectado con una molécula de hemaglutinina (HA) de virus influenza A H5 que comprende una sustitución de aminoácido en el sitio de unión a receptores, en donde la molécula de HA sustituida comprende el aminoácido asparagina en la posición correspondiente a la posición 223 en la HA H5, en donde la molécula de HA no se origina con el aislado de H5 humano A/HK/213/03 y la inclusión de asparagina en la posición 223 da como resultado una reactividad incrementada con antisueros obtenidos a partir de un animal expuesto a un virus influenza.
15. El método según la reivindicación 14, que da como resultado un incremento de al menos 2 veces de la sensibilidad de un ensayo de inhibición de la hemaglutinina (HI).
16. El método según la reivindicación 14, que da como resultado un incremento de al menos 4 veces de la sensibilidad de un ensayo de inhibición de la hemaglutinina (HI).
17. Un método diagnóstico para determinar si un animal ha sido expuesto a un virus influenza, comprendiendo

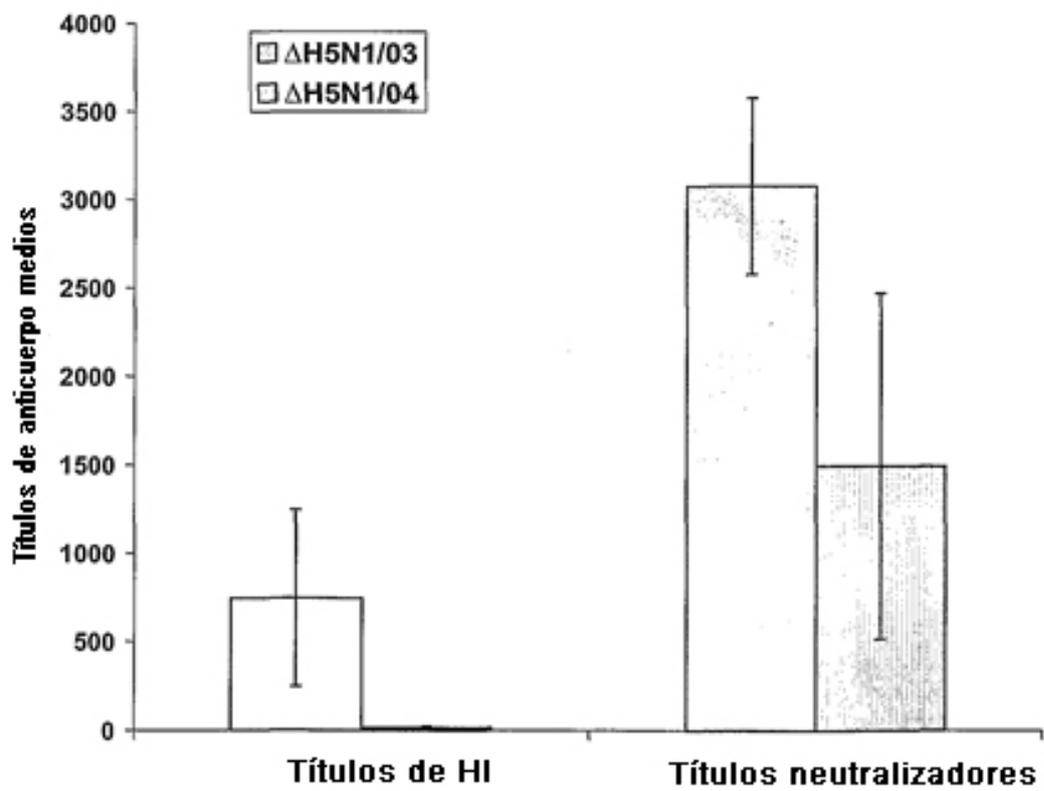
- 5 el método hacer reaccionar antisueros obtenidos a partir del animal con un virus de referencia diagnóstico, que se deriva del virus influenza en cuestión pero que comprende una molécula de hemaglutinina (HA) de virus influenza A H5 que comprende una sustitución de aminoácido en el sitio de unión a receptores, en donde la molécula de HA sustituida comprende el aminoácido asparagina en la posición correspondiente a la posición 223 en la HA H5, en donde la molécula de HA no se origina con el aislado de H5 humano A/HK/213/03 y la inclusión de asparagina en la posición 223 da como resultado una reactividad incrementada con los antisueros obtenidos a partir de un animal expuesto a un virus influenza.
- 10 18. Un método diagnóstico para determinar si un animal ha sido expuesto a un virus influenza, comprendiendo el método hacer reaccionar antisueros obtenidos a partir del animal con un virus de referencia diagnóstico, que se deriva del virus influenza en cuestión pero que comprende una molécula de HA de virus influenza A H5 que comprende el aminoácido asparagina en la posición correspondiente a la posición 223 en la HA H5, en donde la molécula de HA no se origina con el aislado de H5 humano A/HK/213/03 y la inclusión de asparagina en la posición 223 da como resultado una reactividad incrementada con los antisueros obtenidos a partir de un animal expuesto a un virus influenza.
- 15 19. El método según cualquiera de las reivindicaciones 12, 17 o 18, en donde el animal es un hurón.
- 20 20. El método según cualquiera de las reivindicaciones 12, 17 o 18, en donde el animal es un ser humano.
21. Un virus de vacuna de la influenza que comprende una molécula de hemaglutinina (HA) de virus influenza A H5 que comprende una sustitución de aminoácido en el sitio de unión a receptores, en donde la molécula HA sustituida comprende el aminoácido asparagina en la posición correspondiente a la posición 223 en la HA H5, en donde la molécula HA no se origina con el aislado de H5 humano A/HK/213/03 y la inclusión de asparagina en la posición 223 da como resultado una reactividad incrementada con antisueros obtenidos a partir de un animal expuesto a un virus influenza.
- 25 22. Un ácido nucleico aislado codificante de la molécula de HA del virus influenza A H5 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 30 23. Un método para preparar el ácido nucleico según la reivindicación 22, comprendiendo el método introducir una secuencia de nucleótidos en un ácido nucleico que codifica la molécula de HA del virus influenza A H5 que no presenta la sustitución de aminoácido en el sitio de unión a receptores, que da como resultado una sustitución de aminoácido, en donde la molécula de HA H5 sustituida comprende el aminoácido asparagina en la posición correspondiente a la posición 223 en la HA H5.
- 35 24. Una molécula de HA del virus influenza A H5 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para uso como medicamento en el tratamiento o la prevención de una infección por virus influenza.
25. Uso de una molécula de HA de virus influenza A H5 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una infección por virus influenza.
26. Un virus influenza recombinante que comprende la molécula de HA del virus influenza A H5 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para uso como medicamento en el tratamiento o la prevención de una infección por virus influenza.
27. Uso de un virus influenza que comprende la molécula de HA del virus influenza A H5 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una infección por virus influenza.

**Figura 1.**

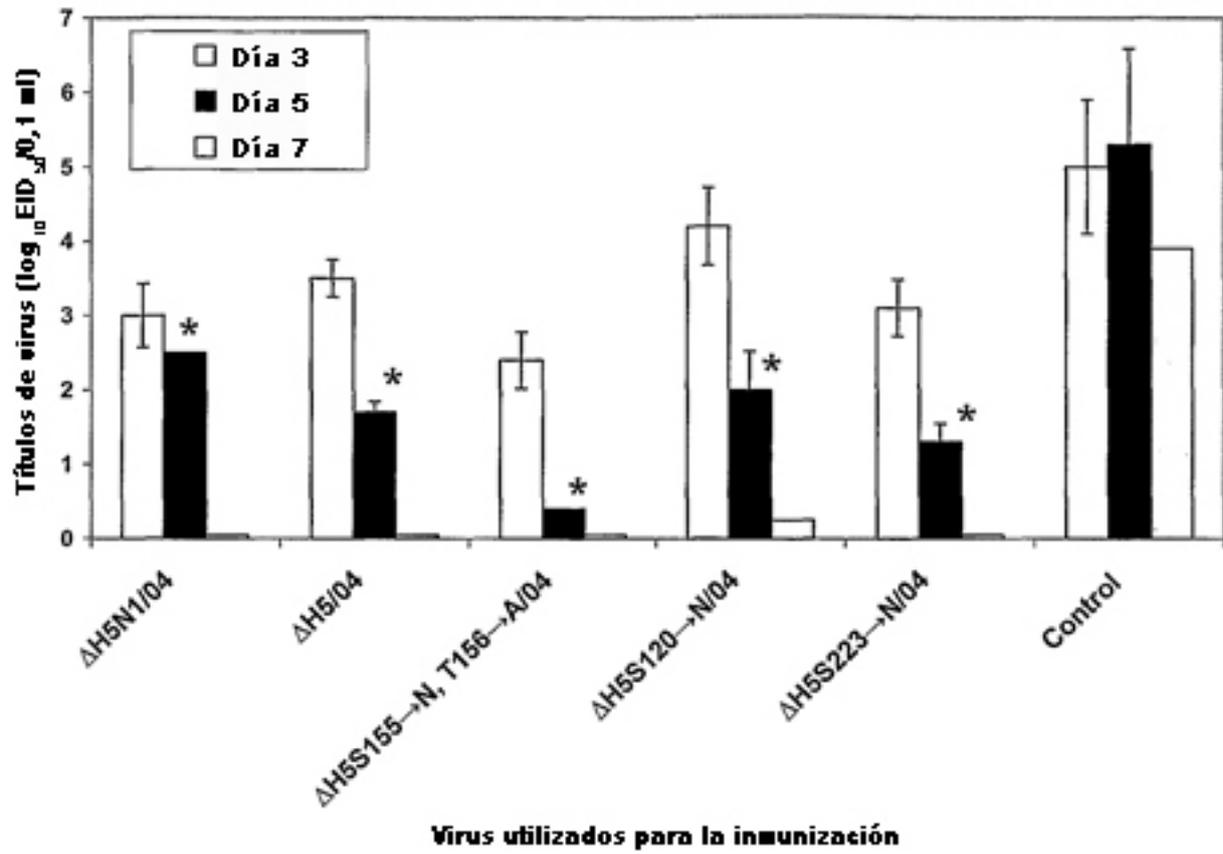
**A**



**B**



**Figura 2**



**Figura 3.**

