(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 739 123**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/10 (2006.01)
A61K 39/145 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.08.2014 PCT/EP2014/068108**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **05.03.2015 WO15028478**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.08.2014 E 14777272 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019 EP 3039036**

(54) Título: **Nuevos antígenos y anticuerpos de la gripe**

(30) Prioridad:

28.08.2013 US 201361870862 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.01.2020

(73) Titular/es:

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A (50.0%)
Rue de l'Institut, 89
1330 Rixensart Brussels, BE y
THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (50.0%)

(72) Inventor/es:

STEVENS, JAMES;
DONIS, RUBEN;
SHORE, DAVID;
WAN, HONGQUAN y
VASSILEV, VENTZISLAV BOJIDAROV

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 739 123 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

Nuevos antígenos y anticuerpos de la gripe

Derechos gubernamentales

La presente invención se creó en la realización de un Acuerdo de Investigación y Desarrollo Cooperativo con los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades, una agencia del Departamento de Salud y Servicios Humanos. El gobierno de los Estados Unidos tiene ciertos derechos en la presente invención. Los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades y GlaxoSmithKline Biologicals SA, las partes del Acuerdo de Investigación y Desarrollo Cooperativo NCRID-08-317-00, contribuyeron a esta invención conjunta.

Campo técnico

La presente invención se refiere a nuevos antígenos de la gripe, a nuevas composiciones inmunogénicas o de vacuna, así como a usos de y a procedimientos para producir dichos antígenos y composiciones. En particular, la invención se refiere a formas modificadas de hemaglutinina (HA) que, tras usarse como antígeno, tienen la capacidad de dirigir respuestas inmunitarias contra regiones genéticamente más conservadas de HA. Además, se proporcionan anticuerpos que se unen a dichas regiones y usos de dichos anticuerpos.

Antecedentes de la invención

Los virus de la gripe son unos de los virus más ubicuos más ubicuos presentes en el mundo, afectando tanto a seres humanos como a ganado. La gripe da como resultado una carga económica, morbilidad e incluso mortalidad, que son significativas. Hay tres tipos de virus de la gripe: A, B y C.

El virus de la gripe es un virus envuelto que consiste básicamente en una nucleocápside interna o núcleo de ARN asociado con nucleoproteína, rodeado de una envuelta vírica con una estructura de bicapa lipídica y glucoproteínas externas. La capa interna de la envuelta vírica está compuesta predominantemente de proteínas de matriz y la capa externa principalmente de material lipídico procedente del hospedador. El virus de la gripe comprende dos antígenos de superficie predominantes, las glucoproteínas HA y neuraminidasa (NA), que aparecen como puntas en la superficie de las partículas. Son estas proteínas de superficie, en particular HA, las que determinan la especificidad antigénica de los subtipos de la gripe.

Las cepas de virus se clasifican de acuerdo con la especie hospedadora de origen, el sitio geográfico y el año de aislamiento, el número de serie y, para la gripe A, según las propiedades de los subtipos de HA y NA. Se han identificado 16 subtipos de HA (H1-H16) y nueve subtipos de NA (N1-N9) para los virus de la gripe A (Webster y col. (1992) Microbiol. Rev. 56: 152; Fouchier y col. (2005) J. Virol. 79: 2814). Se han recuperado virus de todos los subtipos de HA y NA de aves acuáticas, pero solo tres subtipos de HA (H1, H2 y H3) y dos subtipos de NA (N1 y N2) han establecido linajes estables en la población humana desde 1918. Se reconocen solo un subtipo de HA y uno de NA para los virus de la gripe B.

Los virus de tipo gripe A evolucionan y sufren una continua variabilidad antigénica (Wiley y Skehel (1987) Ann. Rev. Biochem. 56: 365). La ausencia de comprobación de errores por parte de la ARN polimerasa vírica provoca una alta tasa de errores de transcripción que da como resultado sustituciones de aminoácidos en las glucoproteínas de la superficie.

La vacunación desempeña un papel crucial en el control de las epidemias de gripe. Debido a la variabilidad antigénica, los pacientes tienen que recibir una vacunación anual contra los virus de la gripe que se predicen basándose en los datos de vigilancia vírica para obtener inmunidad contra los virus en circulación.

Sería interesante tener una vacuna contra la gripe que no esté restringida a la especificidad de cepa inherente, sino que pueda proporcionar una amplia protección contra un amplio espectro de cepas de la gripe. Dicha vacuna de la gripe "universal" podría prepararse potencialmente empleando epítopos conservados evolutivamente estables. Se ha propuesto producir dichas vacunas universales usando las proteínas M2 y NP altamente conservadas como antígenos (Kaiser (2006) Science 312: 380). Sin embargo, estas proteínas no son abundantes en la superficie de los viriones y las respuestas contra M2 y NP son mucho más débiles que las inducidas por vacunas estacionales convencionales.

HA es abundante en la superficie de los viriones de la gripe y es la principal diana de la respuesta inmunitaria contra las vacunas convencionales, tales como vacunas divididas. Sin embargo, la molécula de HA es altamente variante y la respuesta inmunitaria contra HA es predominantemente contra las regiones más variables. Por lo tanto, tras la vacunación o infección por gripe, la respuesta inmunitaria se dirige principalmente a un número limitado de determinantes antigénicos de HA específicos para la cepa y en continua evolución, lo que da como resultado una reactividad cruzada muy limitada.

Steel y col. (2010, MBio, 1:1) han descrito una vacuna contra el virus de la gripe basada en el dominio del tallo de HA conservado. Sin embargo, los anticuerpos contra el dominio de cabeza tienen más probabilidades de bloquear la infección interfiriendo con la unión del virión a los receptores de ácido siálico de la célula hospedadora. Por lo tanto,

sería interesante tener un antígeno de HA "universal" que incluya el dominio de cabeza. El documento WO2012082634 describe sustituciones de aminoácidos en HA que reducen las respuestas a epítopos hipervariables dominantes y por tanto, dirige las respuestas más hacia regiones conservadas de HA.

Sin embargo, sigue habiendo una necesidad de nuevos antígenos de gripe que puedan inducir una respuesta inmunitaria que proporcione amplia protección contra un amplio espectro de cepas de gripe.

La inmunización pasiva con anticuerpos es otra vía potenciar de combatir la enfermedad gripal. Por ejemplo, Okuno y col. (1994, J Virol. 68: 517) han descrito la protección contra la cepa del virus de la gripe A adaptada para ratones A/FM/1/47 en ratones mediante un anticuerpo monoclonal con actividad neutralizante cruzada entre cepas con H1 y H2. De forma similar, Smirnov y col. (2000, Arch Virol. 145: 1733) han descrito la prevención y el tratamiento de la bronconeumonía en ratones provocada por una variante adaptada para ratones del virus de la gripe A H5N2 aviar usando un anticuerpo monoclonal contra un epítopo conservado en la región de tallo de HA.

Sin embargo, sigue habiendo necesidad de nuevos anticuerpos anti-HA que muestren actividad neutralizante contra un amplio espectro de cepas de gripe.

Resumen de la invención

Los inventores han aislado y caracterizado anticuerpos monoclonales anti-HA que a la vez son neutralizantes y se unen a regiones a regiones conservadas en HA, permitiendo de este modo la unión a HA de una gran variedad de cepas de gripe. Estas propiedades funcionales hacen que los anticuerpos sean potencialmente útiles para el tratamiento y/o la prevención de la infección y/o enfermedad gripal, incluso en situaciones en las que la cepa que provoca la (potencial) infección y/o enfermedad no se ha identificado con precisión.

Además, la identificación de los epítopos conservados a los que se unen estos anticuerpos permitieron el diseño de antígenos de HA modificados para vacunación, en los que se cubren las regiones hipervariables de HA usando glucosilación unida a Asn y por lo tanto, las respuestas inmunitarias se dirigen potencialmente a regiones más conservadas del antígeno, proporcionando un ámbito de protección más amplio.

En consecuencia, en un primer aspecto de la invención, se proporciona un antígeno de HA de gripe modificado que comprende glucosilación unida a Asn adicional en al menos dos parches superficiales seleccionados entre el grupo de parches superficiales que consisten en: Sitio A, Sitio B, Sitio C, Sitio D y Sitio E, en el que dicho antígeno de hemaglutinina modificado es un antígeno de hemaglutinina aislado de la naturaleza, que tiene glucosilación unida a Asn adicional en comparación con la glucosilación unida a Asn presente en la hemaglutinina de las principales cepas de origen natural del mismo subtipo.

En un aspecto adicional, se proporciona un polinucleótido que codifica un antígeno de HA modificado como se describe en el presente documento.

En un aspecto adicional, se proporciona una composición inmunogénica que comprenden un antígeno como se describe en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto adicional, se proporciona un procedimiento para producir un antígeno como se define en el presente documento que comprende expresar un polinucleótido como se define en el presente documento en una célula eucariota.

En un aspecto adicional más, se proporciona un procedimiento de prevención y/o tratamiento contra la enfermedad gripal, que comprende la administración de un antígeno o composición inmunogénica como se define en el presente documento a una persona que lo necesite.

También se describe en el presente documento un anticuerpo anti-HA que compite por la unión a HA con un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 como se exponen en las SEQ ID NO: 6, 7 y 8 y una cadena ligera que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 como se exponen en las SEQ ID NO: 9, 10 y 11.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: A) Representación superficial de Viet04 H5 HA1, que resalta las mutaciones usadas para el mapeo de epítopos en la superficie de HA1 agrupadas en los sitios A, B, C, D y E, respectivamente. Se muestra un solo resto de ácido siálico en el sitio de unión a ácido siálico (entre D183N y K140E) para ilustrar la ubicación relativa de los sitios antigénicos. B) Representación superficial del monómero HA1/HA2 de H5 HA, que muestra la orientación relativa de HA1, HA2, el sitio de unión a receptor (RBS) y mutantes de CHO. HA1 está colorado en blanco, HA2 se encuentra en gris y los restos de Asn que se han introducido o modificado para N-glucosilación adicional (mutantes de CHO) están coloreados en negro.

Figura 2: Caracterización cinética de la interacción de los Ac 1A2, 5C5 y 7B8 con HA recombinante de Viet04 (H5N1, clado 1; grupo 1), Indo05 (H5N1, clado 2.1; grupo 1), A/Egipto/N03072/2010 (H5N1, clado 2.2.1; grupo 1), Anhui05 (H5N1, clado 2.3.4: grupo 1, A/Hubei/1/2010 (H5N1, clado 2.3.2; grupo 1), A/Darwin/2001/2009 (H1N1;

grupo 1), A/Brisbane/59/2007 (H1N1; grupo 1), A/Hong Kong/2108/2003 (H9N2; grupo 1), A/Brisbane/10/2007 (H3N2; grupo 2) y A/Nueva York/107/2003 (H7N2; grupo 2). Las mediciones se efectuaron usando un sistema Octet Red (Fortebio Inc.).

Figura 3: Eficacia profiláctica y terapéutica de los Ac anti-H5, 1A2, 5C5 y 7B8, en ratones contra H5N1. A) Eficacia profiláctica como porcentaje de supervivencia de ratones tratados con Ac anti-H5 (10 mg/kg), 2 h después de la exposición letal con 10 DL50 de A/Vietnam/1203/2004 (Viet04) de tipo silvestre. B) y C) Eficacia terapéutica en ratones a los que se inyectan los Ac a las 24 h o 48 h después de la infección, respectivamente; la dosis de anticuerpo y la exposición al virus fueron idénticas en los tres experimentos. Las curvas para 5C5 se solapan con las de 1A2 en los paneles A y B (supervivencia del 100 %). En el panel C, la curva de 5C5 se solapa con la de 1A2 hasta el día 9 (100 %). Del día 11 en adelante, se solapa con la de 7B8 (80 %).

Figura 4: Estructuras cristalinas y huellas de epítopos del Fab 5C5 y los Fab 1A2 en complejo con Viet04 H5 HA. A) Complejo trimérico de Fab 5C5-H5 ilustrado como una representación de cintas sólidas. Para mayor claridad, se marcan un solo monómero de Fab 5C5-H5, HA1 y HA2. Los otros dos protomeros en el complejo también se representan como una representación de la superficie molecular y los N-carbohidratos se representan como varillas. B) El epítopo neutralizante de 5C5. La superficie molecular de Viet04 abarcada por el 5C5 ilustrada como una representación superficial. Un resto de ácido siálico, modelado en el sitio de unión al receptor, ilustra la ubicación relativa del epítopo de 5C5. Los restos implicados en la especificidad de receptor de Viet04 (Stevens y col. (2006) Science 312: 404) están resaltados. La N-acetil glucosamina próxima a Asn158 resalta la proximidad del epítopo del Ac al sitio de glucosilación. C) El complejo trimérico de Fab 1A2-H5, ilustrado como en la figura 4A. D) El epítopo neutralizante de 1A2. La superficie molecular de Viet04 abarcada por el 1A2 se ilustra como una representación superficial.

Figura 5: Conservación en HA1 entre restos en virus identificados entre 1997-2011. A) Superficie molecular de Viet04 H5 HA, que representa el % de conservación entre H5 HA1 1997-2011; los restos conservados en >99 % se colorean en negro y los restos conservados en <99 %, así como HA2, se colorean en gris. B) También se muestran representaciones equivalentes para los subtipos de H1 estacional (antes de 2009), C) H1 contemporánea (2000-2009) y D) H3 (2000-2011).

Figura 6: Sitios antigénicos de las HA H1 y H5. A) El alineamiento de secuencia de H1 (A/Carolina del sur/1/1918 y A/Brisbane/59/2007) con H5 (A/Vietnam/1203/04) ilustra un alto grado de similitud de secuencia entre los subtipos H1 y H5. Los sitios antigénicos (Sa, Sb, Ca y Cb) se marcan e indican como texto recuadrado, en color gris claro y los restos entre los epítopos de 5C5 y 1A2 se resaltan por estrellas huecas y sólidas, respectivamente. B) Una representación superficial de HA1/HA2 de HA de H1N1 (PDB: 1RD8 (Stevens y col. (2004) Science 303: 1866), representa las ubicaciones relativas de los sitios antigénicos identificados en los virus H1 (Sa, Sb, Ca y Cb) en la superficie de HA H5. Los restos espacialmente equivalentes a aquellos entre los epítopos de 1A2 y 5C5 se indican como varillas y rodeados por un círculo. Los sitios antigénicos de H1 están sombreados y marcados.

Figura 7*:* Investigación de la base molecular para la neutralización de virus H5 mediante 5C5 y 1A2. Se produjeron del siguiente modo virus vivos usados en este ensayo; VN1203: RG-A/Vietnam/1203/04-PR8, Anhui/5: RG-A/Anhui/5/2005-PR8, Indo/05: A/Indonesia/5/2005-PR8, Faisán/NJ: RG-A/Faisán/Nueva Jersey/4/93-PR8, Brisbane/59: RG-A/Brisbane/59/2007-PR8. A) Ensayo de inhibición de hemaglutinina (HI) para IgG, Fab2' y fragmentos Fab de 1A2 y 5C5. Los datos de HI se expresan como la inversa de los títulos por cada 0,1 mg/ml de anticuerpo/Fab2'/Fab, respectivamente. Un resultado sin inhibición de la aglutinación se indica mediante un guion. B) Ensayo de microneutralización (MN) para IgG, Fab2' y fragmentos Fab de 1A2 y 5C5. Los datos de MN se expresan como la inversa de los títulos (del criterio de valoración de dilución) por cada 80 µg/ml de anticuerpo/Fab2'/Fab; se considera que los títulos < 16 representan ausencia de actividad de MN. Para el cálculo de la concentración, se consideró que la IgG tenía un PM = 150 kDa, Fab2' = 100 kDa y Fab = 50 kDa. C) Gráficas de isotermas de afinidad k_{disoc}/k_{asoc} para 1A2 y D) moléculas IgG, Fab y Fab2' de 5C5 que se unen a HA recombinante de Viet04 y Anhui05, respectivamente. Se llevaron a cabo mediciones de interferometría de biocapas usando un sistema Octet Red (Fortebio Inc.). E) Ensayo de protección de proteasa, como se describe en los procedimientos. SDS-PAGE no reductora de HA de Viet04 a pH 5 o pH 8, incubada con los Acn 5C5 o 1A2 o sola, con o sin tripsina. La digestión tríptica de HA de Viet04 a pH 5,0 en presencia de los Ac 1A2 y 5C5 suprime la neutralización previniendo los cambios conformacionales inducidos por el pH en HA2.

Figura 8: Alineamiento de secuencia de restos estructuralmente equivalentes a los epítopos de 5C5 y 1A2 (aminoácidos de HA enterrados por la unión del Fab) de Viet04 a lo largo de diferentes clados de virus H5. A) Restos en el epítopo de 5C5. Los restos que influencian la especificidad del ácido siálico (Stevens y col. (2006) Science 312: 404) están numerados en rojo. Se resaltan las sustituciones de aminoácidos en relación con Viet04 (clado 1). También se representan los restos mutados para mapear los epítopos de 5C5 y 1A2, subrayándose las mutaciones que redujeron la unión a menos del 85 % del TS. B) alineamiento equivalente de secuencias en el epítopo de 1A2.

Figura 9: Análisis basados en Fortebio del efecto de mutantes de CHO individuales en las interacciones de 1A2 y 5C5. Se representan la reactividad de 5C5 y la reactividad de 1A2. Como antígeno, se usó HA1 de CHO/TS inmovilizada.

Descripción detallada

Definiciones

La expresión "antígeno de hemaglutinina de gripe modificado que comprende glucosilación adicional unida a Asn",

cuando se usa en el presente documento, indica un antígeno de HA que contiene glucosilación adicional unida a Asn en comparación con la glucosilación unida a Asn presente en la HA de la mayoría de cepas de origen natural del subtipo dado, por ejemplo, para H5 (clado 1.0), las principales cepas de origen natural tienen glucosilación unida a Asn potencial en las posiciones 11, 23, 154, 165, 286 (en HA1) así como 484 (posición 154 en HA2).

Típicamente, la secuencia codificante para HA de una cepa de origen natural se ha modificado para introducir sitios aceptores para glucosilación unida a Asn en una posición distinta de 11, 23, 154, 165, 286 o 484. Los sitios aceptores para la glucosilación unida a Asn tienen la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr, en la que X no es Pro. Los sitios aceptores pueden introducirse de diversos modos, incluyendo introducción, por ejemplo, mediante sustitución, de un sitio de Asn-X-Ser o Asn-X-Thr en una parte de la secuencia en la que no están presentes ninguno de estos restos o por ejemplo, introducción de un codón de Asn dos codones cadena arriba de un codón de Ser o Thr existente o un codón de Ser o Thr dos posiciones cadena debajo de un codón de Asn. En una realización diferente, sin embargo, el antígeno de HA modificado es un antígeno de HA aislado de la naturaleza, que tiene glucosilación unida a Asn adicional en comparación con la glucosilación unida a Asn presente en la HA de las principales cepas de origen natural del mismo subtipo.

Se necesita la presencia de un sitio aceptor para glucosilación unida a Asn, pero no es necesariamente suficiente para la expresión de un antígeno de HA de gripe modificado que comprenda glucosilación adicional unida a Asn. Algunas sustituciones de aminoácidos pueden provocar un mal plegamiento y por lo tanto, impedir la producción funcional de proteína. Otras sustituciones de aminoácidos pueden permitir un plegamiento correcto, pero su ubicación estructural puede de hecho impedir que el sitio aceptor se glucosile. Las técnicas para evaluar la producción de un antígeno de HA de gripe funcional modificado que comprende glucosilación adicional unida a Asn se describen en los ejemplos en el presente documento. Se han descrito en la materia técnicas alternativas.

La expresión "posición correspondiente a ### (por ejemplo, 140)", cuando se usa en el presente documento, se refiere a una posición en una HA que no es de A/Vietnam/1203/04, diciéndose de dicha HA que es estructuralmente equivalente a la posición ### en A/Vietnam/1203/04. "Estructuralmente equivalente" significa que el resto de aminoácido está ubicado de manera similar en relación con la estructura tridimensional de dicha HA. En algunos casos, el número de aminoácido, contando desde el extremo N-terminal, puede ser el mismo que en HA de A/Vietnam/1203/04, pero en otros casos, el número puede ser diferente, por ejemplo, el número contando desde el extremo N-terminal de dicha HA puede ser ### menos 3 (por ejemplo, 137), ### menos 2, ### menos 1, ### más 1, ### más 2, ### más 3 (por ejemplo, 143) o una posición que incluso se retira de ###. Pueden identificarse restos de aminoácidos estructuralmente equivalentes usando modelado empleando como punto de partida HA de A/Vietnam/1203/04. El resto de aminoácido estructuralmente equivalente puede ser el mismo que la posición ### en HA de A/Vietnam/1203/04 o el resto de aminoácido puede ser diferente (por ejemplo, un aminoácido estructuralmente equivalente a Lys 140 de HA de A/Vietnam/1203/04 puede ser, por ejemplo, una Arg en la posición 141 de dicha HA).

La expresión "proteína madura", cuando se usa en el presente documento, se refiere al componente del ectodominio (es decir, extracelular) de cada polipéptido que está presente en la proteína HA de tipo silvestre en la superficie celular. La proteína se ha producido y procesado por la maquinaria de síntesis de proteínas y se ha retirado el péptido de señal. La numeración de la secuencia de aminoácidos de la proteína madura es consecutiva desde el extremo amino (N-) terminal hasta el resto carboxilo (-C) terminal, de tal forma que la posición 1 corresponde al resto en el extremo N-terminal de cada subdominio en la HA de tipo silvestre como se encuentra en los viriones. Como tal, cualquier resto adicional diseñado en el extremo N-terminal, tal como aquellos que se introducen como parte de la estrategia de expresión o con fines de solubilización o purificación, se numeran en orden inverso (es decir, de -C a N-terminal) desde la posición 1, partiendo de la posición 0 (por ejemplo, 0, -1, -2, etc.). Obsérvese que la numeración consecutiva de las proteínas HA contrasta con otros sistemas reconocidos para la numeración de proteínas HA, tales como los sistemas de numeración de "H3" y "H1", que se refiere al grado de relación estructural entre los subtipos de proteínas HA y no necesariamente numeran a los restos en orden consecutivo.

Los términos "HA1", "cadena de HA1" o "componente de HA1", cuando se usan en el presente documento, se refieren a la región de la proteína HA que incluye los restos de aminoácido de aproximadamente 1-330 de la proteína hemaglutinina madura. La cadena de HA1 comprende todos los restos que se encuentran en N-terminal respecto del péptido de escisión de HA1/HA2 de la proteína HA0 precursora, incluyendo el dominio de unión a receptor de la proteína HA (véanse las figuras 1b y 4).

Los términos "HA2", "cadena de HA2" o "componente de HA2", cuando se usan en el presente documento, se refieren a la región de la proteína HA que incluye los restos de aminoácido de aproximadamente 331-504 del polipéptido de hemaglutinina HA0 maduro. Cabe destacar que, estos restos en la cadena HA2, normalmente se numeran independientemente de los de HA1, de tal forma que los restos de HA2 pueden numerarse de manera consecutiva de 1-174. La cadena de HA2 comprende todos los restos que se encuentran en C-terminal respecto del péptido de escisión de HA1/HA2 de la proteína HA0 precursora, que incluye el péptido hidrófobo responsable de la inserción en la membrana de la célula hospedadora durante el proceso de fusión de la membrana (véanse las figuras 1B y 4).

La expresión "tallo de HA", cuando se usa en el presente documento, se refiere a la región de la proteína HA que incluye los restos de aproximadamente 1-42 y 274-330 de la cadena de HA1, así como los restos (1-174) de la cadena de HA2. El tallo se ubica en la región próxima a la membrana de HA, directamente por debajo del dominio de esterasa

vestigial de la cabeza globular de HA1.

Aspectos y realizaciones adicionales de la invención

Como se ha explicado anteriormente, en un aspecto, la invención se refiere a un antígeno de hemaglutinina (HA) de gripe modificado que comprende glucosilación unida a Asn adicional en al menos dos parches superficiales seleccionados entre el grupo de parches superficiales que consisten en: Sitio A, Sitio B, Sitio C, Sitio D y Sitio E, en el que dicho antígeno de hemaglutinina modificado es un antígeno de hemaglutinina aislado de la naturaleza, que tiene glucosilación unida a Asn adicional en comparación con la glucosilación unida a Asn presente en la hemaglutinina de las principales cepas de origen natural del mismo subtipo.

El Sitio A se define como el parche superficial que consiste en los restos de superficie en la proteína madura de HA del virus A/Vietnam/1203/04, como se expone en la Lista A o los restos de superficie correspondientes a los de la Lista A en la proteína madura de HA de un virus de la gripe diferente.

Lista A:

Q115, P118, K119, S120, S121, H125, E126, A127, S128, L129, V131, S133, A134, P136, Y137, Q138, G139, K140, S141, S142, R145, N146, V148, R162 y Y164.

El Sitio B se define como el parche superficial que consiste en los restos de superficie en la proteína madura de HA del virus A/Vietnam/1203/04, como se expone en la Lista B o los restos de superficie correspondientes a los de la Lista B en la proteína madura de HA de un virus de la gripe diferente.

Lista B:

S123, S124, 1151, K152, K153, N154, S155, T156, T159, K161, N182, D183, A184, A185, E186, T187, K188, L189, Q192, N193 y P194.

El Sitio C se define como el parche superficial que consiste en los restos de superficie en la proteína madura de HA del virus A/Vietnam/1203/04, como se expone en la Lista C o los restos de superficie correspondientes a los de la Lista C en la proteína madura de HA de un virus de la gripe diferente.

Lista C:

E34, K35, K36, H37, N38, K40, L41, C42, D43, L44, E270, G272, N273, N275, T276, K277, F291, 1294, P296, L297, E301, C302, K304, Y305, V306, K307, S308, N309 y R310

El Sitio D se define como el parche superficial que consiste en los restos de superficie en la proteína madura de HA del virus A/Vietnam/1203/04, como se expone en la Lista D o los restos de superficie correspondientes a los de la Lista D en la proteína madura de HA de un virus de la gripe diferente.

Lista D:

L89, F95, N96, E112, 1114, S163, N165, N166, T167, N168, Q169, E170, D171, L172, L175, 1178, Y197, S199, S203, T204, L205, R208, L209, V210, P211, R212, 1213, A214, T215, Q222, S223, G224, R225, M226, K234, N236, A238, N240, E242, S243, N244

El Sitio E se define como el parche superficial que consiste en los restos de superficie en la proteína madura de HA del virus A/Vietnam/1203/04, como se expone en la Lista E o los restos de superficie correspondientes a los de la Lista E en la proteína madura de HA de un virus de la gripe diferente.

Lista E:

K48, L50, R53, D54, A58, M66, E69, 171, N72, V73, P74, E75, Y78, 179, V80, A83, N84, V86, K102, H110, V257, K258, K259 y S262

En una realización, el antígeno de HA comprende glucosilación adicional unida a Asn unida a:

i) uno o más restos de aminoácido del Sitio A y
ii) uno o más restos de aminoácido del Sitio B,

comprendiendo además opcionalmente glucosilación adicional unida a Asn unida a uno o más restos de aminoácido del Sitio D.

En otra realización, el antígeno de HA comprende glucosilación adicional unida a Asn unida a:

i) uno o más restos de aminoácido del Sitio C,
ii) uno o más restos de aminoácido del Sitio D y
iii) uno o más restos de aminoácido del Sitio E,

comprendiendo además opcionalmente glucosilación adicional unida a Asn unida a uno o más restos de aminoácido del Sitio A.

En una realización adicional, el antígeno de HA comprende glucosilación adicional unida a Asn unida a:

i) uno o más restos de aminoácido del Sitio A,
ii) uno o más restos de aminoácido del Sitio B y
iii) uno o más restos de aminoácido del Sitio E,

que comprende además opcionalmente glucosilación adicional unida a Asn unida a:

i) uno o más restos de aminoácido del Sitio C y
ii) uno o más restos de aminoácido del Sitio D.

En una realización adicional, el antígeno HA descrito en el presente documento comprende además glucosilación adicional unida a Asn unida a uno o más restos de aminoácido del Sitio A, Sitio B, Sitio C, Sitio D o Sitio E o cualquier combinación de los mismos.

En una realización específica, se ha efectuado una sustitución de Lys a Asn en la posición 140 de la SEQ ID NO: 1 o se ha modificado una variante de la SEQ ID NO: 1 para introducir un sitio aceptor para glucosilación unida a Asn en la posición 140 o una posición correspondiente a 140.

En otra realización, se ha efectuado una sustitución de Glu a Asn en la posición 126 de la SEQ ID NO: 1 o se ha modificado una variante de la SEQ ID NO: 1 para introducir un sitio aceptor para glucosilación unida a Asn en la posición 126 o una posición correspondiente a 126.

En una realización adicional, se ha efectuado una sustitución de Lys a Asn en la posición 119 de la SEQ ID NO: 1 o se ha modificado una variante de la SEQ ID NO: 1 para introducir un sitio aceptor para glucosilación unida a Asn en la posición 119 o una posición correspondiente a 119.

En una realización adicional, se ha efectuado una sustitución de Ser a Asn en la posición 121 de la SEQ ID NO: 1 o se ha modificado una variante de la SEQ ID NO: 1 para introducir un sitio aceptor para glucosilación unida a Asn en la posición 121 o una posición correspondiente a 121.

En una realización adicional, se ha efectuado una sustitución de Gln a Asn en la posición 192 de la SEQ ID NO: 1 y se ha efectuado una sustitución de Pro a Thr o de Pro a Ser en la posición 194 de la SEQ ID NO: 1 o se han sustituido restos correspondientes en una variante de la SEQ ID NO: 1 para introducir un sitio aceptor para glucosilación unida a Asn en la posición 192.

En una realización adicional, se ha efectuado una sustitución de Pro a Asn en la posición 194 de la SEQ ID NO: 1 o se ha modificado una variante de la SEQ ID NO: 1 para introducir un sitio aceptor para glucosilación unida a Asn en la posición 194 o una posición correspondiente a 194.

En una realización adicional, se ha efectuado una sustitución de Lys a Asn en la posición 307 de la SEQ ID NO: 1 y se ha efectuado una sustitución de Asn a Thr o de Asn a Ser en la posición 309 de la SEQ ID NO: 1 o se han sustituido restos correspondientes en una variante de la SEQ ID NO: 1 para introducir un sitio aceptor para glucosilación unida a Asn en la posición 307.

En una realización adicional, se ha efectuado una sustitución de Glu a Ser o de Glu a Thr en la posición 242 de la SEQ ID NO: 1 o se ha modificado una variante de la SEQ ID NO: 1 para introducir un sitio aceptor para glucosilación unida a Asn en la posición 240 o una posición correspondiente a 240.

En una realización adicional, se ha efectuado una sustitución de Pro a Ser o de Pro a Thr en la posición 74 de la SEQ ID NO: 1 o se ha modificado una variante de la SEQ ID NO: 1 para introducir un sitio aceptor para glucosilación unida a Asn en la posición 72 o una posición correspondiente a 72.

En una realización específica:

- se ha efectuado una sustitución de Lys a Asn en la posición 140 de la SEQ ID NO: 1 o se ha modificado una variante de la SEQ ID NO: 1 para introducir un sitio aceptor para glucosilación unida a Asn en la posición 140 o una posición correspondiente a 140 y
- se ha efectuado una sustitución de Glu a Asn en la posición 126 de la SEQ ID NO: 1 o se ha modificado una variante de la SEQ ID NO: 1 para introducir un sitio aceptor para glucosilación unida a Asn en la posición 126 o una posición correspondiente a 126 y
- se ha efectuado una sustitución de Pro a Asn en la posición 194 de la SEQ ID NO: 1 o se ha modificado una variante de la SEQ ID NO: 1 para introducir un sitio aceptor para glucosilación unida a Asn en la posición 194 o una posición correspondiente a 194.

En una realización específica adiciona:

- se ha efectuado una sustitución de Lys a Asn en la posición 140 de la SEQ ID NO: 1 o se ha modificado una variante de la SEQ ID NO: 1 para introducir un sitio aceptor para glucosilación unida a Asn en la posición 140 o una posición correspondiente a 140 y
- se ha efectuado una sustitución de Glu a Asn en la posición 126 de la SEQ ID NO: 1 o se ha modificado una variante de la SEQ ID NO: 1 para introducir un sitio aceptor para glucosilación unida a Asn en la posición 126 o una posición correspondiente a 126 y
- se ha efectuado una sustitución de Pro a Asn en la posición 194 de la SEQ ID NO: 1 o se ha modificado una variante de la SEQ ID NO: 1 para introducir un sitio aceptor para glucosilación unida a Asn en la posición 194 o una posición correspondiente a 194 y
- se ha efectuado una sustitución de Pro a Ser o de Pro a Thr en la posición 74 de la SEQ ID NO: 1 o se ha modificado una variante de la SEQ ID NO: 1 para introducir un sitio aceptor para glucosilación unida a Asn en la posición 72 o una posición correspondiente a 72.

En una realización específica adiciona:

- se ha efectuado una sustitución de Lys a Asn en la posición 140 de la SEQ ID NO: 1 o se ha modificado una variante de la SEQ ID NO: 1 para introducir un sitio aceptor para glucosilación unida a Asn en la posición 140 o una posición correspondiente a 140 y
- se ha efectuado una sustitución de Glu a Asn en la posición 126 de la SEQ ID NO: 1 o se ha modificado una variante de la SEQ ID NO: 1 para introducir un sitio aceptor para glucosilación unida a Asn en la posición 126 o una posición correspondiente a 126 y
- se ha efectuado una sustitución de Pro a Asn en la posición 194 de la SEQ ID NO: 1 o se ha modificado una variante de la SEQ ID NO: 1 para introducir un sitio aceptor para glucosilación unida a Asn en la posición 194 o una posición correspondiente a 194 y
- se ha efectuado una sustitución de Lys a Asn en la posición 307 de la SEQ ID NO: 1 y se ha efectuado una sustitución de Asn a Thr o de Asn a Ser en la posición 309 de la SEQ ID NO: 1 o se han sustituido restos correspondientes en una variante de la SEQ ID NO: 1 para introducir un sitio aceptor para glucosilación unida a Asn en la posición 307.

En una realización específica adiciona:

- se ha efectuado una sustitución de Lys a Asn en la posición 140 de la SEQ ID NO: 1 o se ha modificado una variante de la SEQ ID NO: 1 para introducir un sitio aceptor para glucosilación unida a Asn en la posición 140 o una posición correspondiente a 140 y
- se ha efectuado una sustitución de Lys a Asn en la posición 119 de la SEQ ID NO: 1 o se ha modificado una variante de la SEQ ID NO: 1 para introducir un sitio aceptor para glucosilación unida a Asn en la posición 119 o una posición correspondiente a 119 y
- se ha efectuado una sustitución de Lys a Asn en la posición 307 de la SEQ ID NO: 1 y se ha efectuado una sustitución de Asn a Thr o de Asn a Ser en la posición 309 de la SEQ ID NO: 1 o se han sustituido restos correspondientes en una variante de la SEQ ID NO: 1 para introducir un sitio aceptor para glucosilación unida a Asn en la posición 307 y
- se ha efectuado una sustitución de Pro a Ser o de Pro a Thr en la posición 74 de la SEQ ID NO: 1 o se ha modificado una variante de la SEQ ID NO: 1 para introducir un sitio aceptor para glucosilación unida a Asn en la posición 72 o una posición correspondiente a 72.

En una realización específica adiciona:

- se ha efectuado una sustitución de Lys a Asn en la posición 140 de la SEQ ID NO: 1 o se ha modificado una variante de la SEQ ID NO: 1 para introducir un sitio aceptor para glucosilación unida a Asn en la posición 140 o una posición correspondiente a 140 y
- se ha efectuado una sustitución de Ser a Asn en la posición 121 de la SEQ ID NO: 1 o se ha modificado una variante de la SEQ ID NO: 1 para introducir un sitio aceptor para glucosilación unida a Asn en la posición 121 o una posición correspondiente a 121 y
- se ha efectuado una sustitución de Lys a Asn en la posición 307 de la SEQ ID NO: 1 y se ha efectuado una sustitución de Asn a Thr o de Asn a Ser en la posición 309 de la SEQ ID NO: 1 o se han sustituido restos correspondientes en una variante de la SEQ ID NO: 1 para introducir un sitio aceptor para glucosilación unida a Asn en la posición 307 y
- se ha efectuado una sustitución de Pro a Ser o de Pro a Thr en la posición 74 de la SEQ ID NO: 1 o se ha modificado una variante de la SEQ ID NO: 1 para introducir un sitio aceptor para glucosilación unida a Asn en la posición 72 o una posición correspondiente a 72.

En una realización específica adiciona:

- se ha efectuado una sustitución de Lys a Asn en la posición 140 de la SEQ ID NO: 1 o se ha modificado una variante de la SEQ ID NO: 1 para introducir un sitio aceptor para glucosilación unida a Asn en la posición 140 o una posición correspondiente a 140 y
- se ha efectuado una sustitución de Lys a Asn en la posición 307 de la SEQ ID NO: 1 y se ha efectuado una

sustitución de Asn a Thr o de Asn a Ser en la posición 309 de la SEQ ID NO: 1 o se han sustituido restos correspondientes en una variante de la SEQ ID NO: 1 para introducir un sitio aceptor para glucosilación unida a Asn en la posición 307 y

- se ha efectuado una sustitución de Glu a Ser o de Glu a Thr en la posición 242 de la SEQ ID NO: 1 o se ha modificado una variante de la SEQ ID NO: 1 para introducir un sitio aceptor para glucosilación unida a Asn en la posición 240 o una posición correspondiente a 240 y
- se ha efectuado una sustitución de Pro a Ser o de Pro a Thr en la posición 74 de la SEQ ID NO: 1 o se ha modificado una variante de la SEQ ID NO: 1 para introducir un sitio aceptor para glucosilación unida a Asn en la posición 72 o una posición correspondiente a 72.

Li y col. 2013, Veterinary Microbiology 162 (2-4): 614-622 describe mutantes de HA con sustituciones con Asn en las posiciones L129, E139 y K140, todas las cuales se encuentran en el sitio A. El documento WO2011/044152 describe sustituciones con Asn en el dominio de unión a receptor (RBD) en las posiciones 142, 144, 172, 177, 179 y 136.

El antígeno de HA puede ser de cualquier tipo o subtipo (por ejemplo, H1 a H16) de cepa de la gripe. En una realización, el antígeno HA procede de una cepa seleccionada entre el grupo que consiste en: una cepa H1, una H2, una H3, una H5, una H7 y una H9. Preferentemente, el antígeno de HA es de una cepa H5.

En algunas realizaciones, la HA modificada tiene una secuencia que, excepto para las mutaciones para introducir sitios de glucosilación, es idéntica a HA de una cepa pandémica. Por cepa pandémica se entiende un nuevo virus de la gripe contra el que una gran mayoría de la población no tiene inmunidad. Las cepas pandémicas adecuadas son, por ejemplo, H5N1, H9N2, H7N7, H2N2, H7N1, H7N3, H10N7, H5N2 y H1N1. Como alternativa, la HA modificada tiene una secuencia que, excepto para las mutaciones para introducir sitios de glucosilación, es idéntica a HA de una cepa no pandémica.

El antígeno HA puede ser una proteína HA de longitud completa o un fragmento de la misma, por ejemplo, una variante truncada de HA. En particular, en algunas realizaciones, el antígeno HA puede carecer del tallo de HA o de parte del tallo, de tal forma que más de un 25 %, por ejemplo, más de un 50 %, tal como más de un 75 % de los restos de aminoácido del tallo o la ausencia de la parte HA2 del tallo.

El antígeno de HA también puede contener secuencias adicionales que promueven la secreción y/o facilitan la purificación. Dichas secuencias pueden retirarse posteriormente, por ejemplo, tras la purificación.

Como se ha explicado anteriormente, en un aspecto adicional, se proporciona un polinucleótido que codifica un antígeno de HA modificado como se describe en el presente documento. Dicho polinucleótido puede diseñarse y/o generarse basándose en una HA de origen natural, por ejemplo, una HA de una cepa de la gripe aislada de la naturaleza. Por lo tanto, el polinucleótido puede modificarse para introducir secuencia codificante para sitios aceptores de glucosilación unida a Asn, descritos anteriormente. Además, puede modificarse adicionalmente el polinucleótido para eliminar partes de HA, para que codifique un fragmento de HA. En otra realización, puede modificarse el polinucleótido para añadir nucleótidos que codifican secuencias de aminoácidos que promueven la secreción y/o facilitan la purificación.

En un aspecto adicional, se proporciona una composición inmunogénica que comprenden un antígeno como se describe en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una realización, dicha composición comprende además un adyuvante. En una realización, el adyuvante es un adyuvante de emulsión de aceite en agua. Las emulsiones de aceite en agua, tales como MF59 o AS03 se conocen bien en la técnica y se ha sugerido que son útiles como composiciones adyuvantes (documentos EP 399843; WO 95/17210).

En una realización, dicha composición es monovalente, es decir, comprende únicamente una HA de la gripe. En realizaciones alternativas, la composición es monovalente, es decir, comprende múltiples antígenos del virus de la gripe. Por ejemplo, la composición puede ser bivalente, trivalente o cuadrivalente.

En una realización adicional, dicha composición es para su uso en medicina, tal como para su uso en la prevención de la gripe.

En otra realización adicional, dicha composición es para su uso en la prevención de la gripe causada por un clado distinto al clado en el que se basó el antígeno de HA, es decir, un clado diferente al clado al que pertenece el antígeno de HA modificado. Por ejemplo, puede usarse un antígeno de HA modificado del clado 1 para la protección contra la gripe causada por un virus que no sea del clado 1, por ejemplo, un virus del clado 2.

En un aspecto adicional, se proporciona un procedimiento de prevención y/o tratamiento contra la enfermedad gripal, que comprende la administración de un antígeno o composición inmunogénica como se describe en el presente documento a una persona que lo necesite.

En una realización del procedimiento o el uso descrito anteriormente, se administran menos de 15 microgramos, tal como entre 3,75 y 10 microgramos de HA por dosis.

En un aspecto adicional, se proporciona un procedimiento para producir un antígeno como se define en el presente documento que comprende expresar un polinucleótido como se define en el presente documento en una célula eucariota. En una realización, dicha célula es una célula de mamífero, por ejemplo, una célula CHO o una célula de insecto.

Poblaciones a vacunar

La población diana a vacunar con las composiciones inmunogénicas de la invención es la población completa, por ejemplo, adultos jóvenes sanos (por ejemplo, de 18-60 años), ancianos (normalmente de más de 60 años) o bebés/niños. La población diana puede estar particularmente inmunocomprometida. Los humanos inmunocomprometidos generalmente son menos capaces de responder a un antígeno, en particular a un antígeno de la gripe, en comparación con adultos sanos.

En un aspecto de acuerdo con la invención, la población diana es una población que no ha sido cebada contra la gripe, que o bien no se haya expuesto previamente a la gripe (tal como enfrentarse a una cepa pandémica) o que no haya logrado responder previamente a una infección o vacunación contra la gripe. De manera adecuada, la población diana es personas ancianas con una edad adecuada de al menos 60 o 65 años y más, adultos jóvenes de alto riesgo (es decir, de entre 18 y 60 años de edad), tal como personas que trabajan en instituciones sanitarias o aquellos adultos jóvenes con un factor de riesgo, tal como enfermedad cardiovascular y pulmonar o diabetes. Otra población diana es todos los niños de 6 meses de edad y más, que experimentan una tasa de hospitalización relacionada con la gripe relativamente elevada. En particular, la presente invención es adecuada para uso pediátrico en niños de entre 6 meses y 3 años de edad o de entre 3 años y 8 años de edad, tal como de entre 4 años y 8 años de edad o de entre 9 años y 17 años de edad.

La composición de la invención puede administrarse por cualquier vía de administración adecuada, tal como intradérmica, mucosa, por ejemplo, intranasal, oral, intramuscular o subcutánea. Se conocen bien en la técnica otras vías de administración.

La vía de administración intramuscular es particularmente adecuada para la composición contra la gripe con adyuvantes.

En un aspecto de la presente invención, la composición inmunogénica con adyuvantes para la primera administración puede administrarse por vía intramuscular y la composición de refuerzo, tenga o no adyuvantes, puede administrarse por una vía diferente, por ejemplo, intradérmica, subcutánea o intranasal.

Un aspecto de la presente invención proporciona una composición inmunogénica contra la gripe para la revacunación de seres humanos previamente vacunados con una composición inmunogénica de la invención, así como un procedimiento de prevención y/o tratamiento contra la enfermedad gripal, en el que se administra en primer lugar una primera composición inmunogénica de la invención y se administra una segunda composición inmunogénica que comprende un antígeno o una preparación antigénica de al menos una cepa de virus de la gripe.

Normalmente, la revacunación se efectúa al menos 6 meses después de las primeras vacunaciones, de manera adecuada, de 8 a 14 meses después, de manera adecuada, aproximadamente de 10 a 12 meses después.

Regímenes de vacunación, dosificación y criterios de eficacia

De forma adecuada, las composiciones inmunogénicas para su uso de acuerdo con la presente invención son una dosis inyectable de 0,5 ml convencional en la mayoría de los casos y contienen 15 µg o menos, de componente de antígeno de hemaglutinina de una cepa de virus de la gripe, medida por inmunodifusión radial individual (SRD) (J. M. Wood y col.: J. Biol. Stand. 5 (1977) 237-247; J. M. Wood y col., J. Biol. Stand. 9 (1981) 317-330). De manera adecuada, el volumen de dosis de vacuna será de entre 0,25 ml y 1 ml, en particular, un volumen de vacuna convencional de 0,5 ml o 0,7 ml. Se efectuará rutinariamente una ligera adaptación del volumen de dosis dependiendo de la concentración de HA en la muestra a granel original y también dependiendo de la vía de administración, administrándose dosis menores por la vía intranasal o intradérmica. De manera adecuada, dichas composiciones inmunogénicas para su uso de acuerdo con la invención contienen una baja cantidad de antígeno de HA, por ejemplo, cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 µg de HA por cepa de virus de la gripe o que no supere los 15 µg de HA por cepa. Dicha baja cantidad de HA puede ser tan baja como sea prácticamente factible, a condición de que permita formular una vacuna que cumpla con los criterios de eficacia internacionales, por ejemplo, de la UE o la FDA, como se detalla más adelante (véase la tabla 1 y los parámetros específicos expuestos). Una baja cantidad adecuada de HA es de entre 1 a 7,5 µg de HA por cepa de virus de la gripe, de manera adecuada, entre 3,5 a 5 µg, tal como 3,75 o 3,8 µg de HA por cepa de virus de la gripe, normalmente aproximadamente 5 µg de HA por cepa de virus de la gripe. Otra cantidad adecuada de HA es de entre 0,1 y 5 µg de HA por cepa del virus de la gripe, de manera adecuada, entre 1,0 y 2 µg de HA por cepa del virus de la gripe, tal como 1,9 µg de HA por cepa del virus de la gripe.

El medicamento contra la gripe de la invención cumple de manera adecuada ciertos criterios internacionales para vacunas. Se aplican estándares internacionalmente para medir la eficacia de las vacunas contra la gripe. Las variables serológicas se evalúan de acuerdo con criterios de la Agencia Europea para la Evaluación de Productos Medicinales para uso humano (CHMP/BWP/214/96, Comité de Especialidades Farmacéuticas (CPMP). *Nota para la armonización*

de requisitos para vacunas contra la gripe, 1997. CHMP/BWP/214/96 circular N.°°96-0666:1-22) para ensayos clínicos relacionados con procedimientos de concesión de licencias anuales de vacunas contra la gripe (tabla a continuación).

Criterios CHMP

	18 - 60 años	>60 años
Tasa de seroconversión*	>40 %	>30 %
Factor de conversión**	>2,5	>2,0
Tasa de protección***	>70 %	>60 %
* La tasa de seroconversión se define como la proporción de sujetos en cada grupo que tiene un título protector después de la vacunación ≥ 1:40. Dicho de un modo sencillo, la tasa de seroconversión es el % de sujetos que tienen un título de HI antes de la vacunación <1:10 y ≥ 1:40 después de la vacunación. Sin embargo, en caso de que el título inicial sea ≥ 1:10 es necesario que haya un aumento de al menos cuatro veces en la cantidad de anticuerpo después de la vacunación. ** El factor de conversión se define como el múltiplo de aumento en la media geométrica de los títulos séricos de HI (GMT) después de la vacunación, para cada cepa de vacuna. *** La tasa de protección se define como la proporción de sujetos que o bien eran seronegativos antes de la vacunación y tienen un título (protector) de HI después de la vacunación de ≥ 1:40 o que eran seropositivos antes de la vacunación y tienen un aumento significativo de 4 veces en el título después de la vacunación; normalmente se acepta como indicativo de protección.		

Los requisitos son diferentes para poblaciones adultas (18-60 años) y poblaciones ancianas (>60 años). Para vacunas contra la gripe interpandémicas, al menos una de las evaluaciones (factor de seroconversión, tasa de seroconversión, tasa de seroprotección) ha de cumplir los requisitos europeos, para todas las cepas de gripe incluidas en la vacuna. La proporción de títulos igual o mayor a 1:40 se considera la más relevante debido a que se espera que estos títulos sean los que mejor se correlacionan con la protección (Beyer y col. (1998) Clin Drug Invest 15:1). Las composiciones para su uso de acuerdo con la presente invención cumplen de manera adecuada al menos uno de dichos criterios para la cepa de virus de la gripe incluida en la composición (es suficiente un criterio para obtener la aprobación), de manera adecuada al menos dos o típicamente al menos los tres criterios de protección. De manera adecuada, la(s) respuesta(s) anterior(es) se obtiene(n) después de una dosis o después de dos dosis.

En el presente documento también se describe un anticuerpo anti-HA que compite por la unión a hemaglutinina con un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 como se exponen en las SEQ ID NO: 6, 7 y 8 y una cadena ligera que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 como se exponen en las SEQ ID NO: 9, 10 y 11.

En un ejemplo, el anticuerpo se une al mismo epítopo que un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 expuestas en las SEQ ID NO: 6, 7 y 8 y una cadena ligera que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 expuestas en las SEQ ID NO: 9, 10 y 11.

En un ejemplo adicional, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 expuestas en las SEQ ID NO: 6, 7 y 8 y una cadena ligera que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 expuestas en las SEQ ID NO: 9, 10 y 11.

En un ejemplo adicional, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende secuencias como se exponen en la SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que comprende la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 3.

EL anticuerpo puede ser cualquier tipo de anticuerpo, incluyendo cualquier isotipo, por ejemplo, IgG. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado. Además, se prevé el anticuerpo descrito en el presente documento para su uso en el tratamiento o la prevención de la gripe.

Los anticuerpos pueden usarse en combinación con otras moléculas útiles en el diagnóstico, la profilaxis y/o el tratamiento. Pueden usarse *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Por ejemplo, los anticuerpos pueden administrarse junto con una vacuna contra el virus de la gripe o con otros agentes antivíricos.

Los anticuerpos se formularán típicamente para administración parenteral, tal como para administración intravenosa, intramuscular o subcutánea. Tras la formulación, las soluciones se pueden administrar de un modo compatible con la forma de dosificación o una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz. Normalmente se producirá cierta variación en la dosis dependiendo de la afección del sujeto que se esté tratando.

Para evitar dudas, los presentes inventores pretenden que las expresiones "que comprende", "comprender" y "comprende" en el presente documento sean opcionalmente sustituibles por las expresiones "que consiste en", "consistir en" y "consiste en", respectivamente, en todos los casos.

La invención se describirá adicionalmente por referencia a los siguientes ejemplos no limitantes:

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Producción de antígeno y anticuerpos

Virus y hemaglutininas recombinantes

Se propagaron virus A/Vietnam/1203/2004 (H5N1; Viet04), A/Indonesia/05/2005 (H5N1; Indo05), A/BHG/Qinghai/12/2005 (H5N1; Qinghai05), A/Anhui/5/2005 (H5N1; Anhui05), A/pollo/NJ/17169/1993 (H5N2; ckNJ93) y A/Brisbane/59/2007 (H1N1; Bris59) de tipo silvestre u obtenidos mediante genética inversa en huevos embrionados. La inactivación de los virus se llevó a cabo mediante tratamiento con β-propiolactona (BPL; 0,05 %) durante 48 horas a 4 °C (Budowsky y col. (1991) Vaccine 9, 398). Todos los experimentos usando virus de la gripe aviar altamente patógenos de subtipo H5N1 se llevaron a cabo en instalaciones de contención de nivel 3 de bioseguridad que incluían mejoras requeridas por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos y el Programa de Agentes Seleccionados.

Los virus ckNJ93 y Bris59 reorganizados que contenían los genes internos A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1; PR8) en combinación con los genes HA y NA de los virus donantes se obtuvieron mediante reorganización clásica. Los virus HPAI H5N1 de distintos clados, se produjeron mediante procedimientos de genética inversa (RG) para combinar genes HA modificados que carecen del sitio de escisión multibásico y NA de tipo silvestre con los genes restantes de PR8 (O'Neill y Donis (2009) Curr Top Microbiol Immunol 333, 83), proporcionando RG-A/Vietnam/1203/2004-PR8, RG-A/Indonesia/5/2005-PR8 y RG-A/Anhui/5/2005-PR8. Todos los virus reorganizados se cultivaron en huevos embrionados, usando técnicas de cultivo vírico establecidas (Hossain y col. (2010) Clin Vaccine Immunol 18).

Para la producción de hemaglutininas recombinantes, los restos que comprendían los ectodominios de hemaglutinina madura de Viet04 (H5N1, clado 1; grupo 1), Indo05 (H5N1, clado 2.1; grupo 1), Anhui05 (H5N1, clado 2.3.4: grupo 1), A/Egipto/N03072/2010 (H5N1, clado 2.2.1; grupo 1), A/Hubei/1/2010 (H5N1, clado 2.3.2; grupo 1), A/Darwin/2001/2009 (H1N1; grupo 1), A/Brisbane/59/2007 (H1N1; grupo 1), A/Hong Kong/2108/2003 (H9N2; grupo 1), A/Brisbane/10/2007 (H3N2; grupo 2) y A/Nueva York/107/2003 (H7N2; grupo 2) se clonaron en el vector lanzadera de baculovirus pAcGP67-A (BD Pharmigen) y se expresaron como se ha descrito anteriormente (Stevens y col. (2006, Science 312, 404; Carney y col. Clin Vaccine Immunol 17, 1407; Yang y col. PLoS Curr 2, RRN1152; Yang y col. PLoS Pathog 6, e1001081). En resumen, Se infectaron células de *Tricoplusia ni* (High 5) (Invitrogen) con baculovirus Viet04 recombinante a una MOI de 5-10 a 28 °C durante 72 horas. La proteína HA recombinante secretada se purificó del sobrenadante de cultivo tisular mediante cromatografía de afinidad de metal y posterior cromatografía de filtración en gel de exclusión por tamaños (columna Superdex 200 16/60; GE Healthcare). Se retiró el marcador de foldon/histidina C-terminal mediante tratamiento con trombina usando 3U de enzima/mg de HA durante una noche a 4 °C.

Anticuerpos monoclonales anti-H5

Los anticuerpos monoclonales (Acm) murinos anti-HA H5 en este estudio se obtuvieron de diferentes fuentes. Se obtuvieron tres Acm de Rockland Immunochemicals Inc.: VN04-2, VN04-8 y VN04-10. Se generaron otros cinco Acm (5C5.1.1, 16C8.2.7, 16A8.2.3, 17A2.1.2 y 21G8.6) mediante la tecnología de hibridoma convencional, mediante inmunización de ratones con virus H5N1 inactivado (Vietn04, clado 1) en ratones no expuestos previamente. Se obtuvieron 12 Acm adicionales (como se indican en la tabla 1) de ratones BALB/c después de la inmunización con varios virus H5 antigénicamente divergentes; ya sea mediante infección o inyección de virus inactivado y proteínas HA recombinantes.

Los anticuerpos monoclonales 1A2, 1E11, 2H8, 3B7 y 4D4 se produjeron mediante exposición a una dosis subletal (104 mediana de dosis infecciosas en huevo, EID50) de virus RG-A/Indonesia/5/05-PR8 (clado 2.1) vivo, seguido de dos vacunaciones secuenciales con vacuna monovalente de Viet04 (clado 1). Los anticuerpos monoclonales 5G4, 5G11, 5H6, 6C3, 6G12, 6H10 y 7B8 se produjeron mediante inoculación con virus RG-A/Vietnam/1203/04-PR8 (clado 1) vivo, vacuna monovalente de Qinghai05 (clado 2.2) y un refuerzo final con 10 µg de HA recombinante de A/Egret/Egipto/1162NAMRU3/2006 (clado 2.2).

Expresión y purificación de los anticuerpos monoclonales 1A2, 5C5 y 7B8

Se cultivaron células de hibridoma murino 1A2, 5C5 y 7B8 en DMEM (Invitrogen) complementado con L-glutamina 2 mM (Sigma), 50 mg/l de piruvato de sodio (Sigma), aminoácidos no esenciales 1x (Invitrogen) y un 10 % de suero fetal bovino inactivado por calor con ultra bajo contenido de IgG (Invitrogen), usando matraces Celline CL-1000 (BD-Pharmingen). Los anticuerpos IgG monoclonales se purificaron del sobrenadante de cultivo tisular mediante cromatografía de afinidad usando una columna de proteína A Hi-trap (GE Healthcare), de acuerdo con las guías del fabricante.

Ejemplo 2: Ensayos

Ensayo de microneutralización

Los ensayos de microneutralización se llevaron a cabo usando células de riñón canino Madi-Darby (MDCK) obtenidas de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) y se mantuvieron en DMEM, complementado con FBS al 10 % (Invitrogen), penicilina/estreptomicina al 0,1 % y glutamina al 0,1 %. Se llevaron a cabo diluciones seriadas de factor dos de los Ac en un volumen de 50 µl de diluyente vírico en placas de inmunoensayo como se ha descrito anteriormente

(Rowe y col. (1999) J Clin Microbiol 37, 937).

Ensayo de inhibición de la hemaglutinación

Se llevaron a cabo ensayos de inhibición de la hemaglutininación (HI) con eritrocitos de pavo (Universidad de Georgia, Athens, GA) usando procedimientos convencionales, como se ha descrito anteriormente (Hossain y col. (2010) Clin Vaccine Immunol 18). El título de HI se expresó como la función recíproca de la máxima dilución de las muestras que previno la hemaglutininación.

Mapeo de epítopos y ELISA basado en células

Para la expresión de trímeros de HA H5 solubles en la superficie de células de mamífero, se clonó el gen de HA de longitud completa de Viet04 en el vector de expresión pEF-V5His. Se diseñó una exploración que comprende 26 mutaciones puntuales únicas de la HA, que incluyen las mutaciones Lys36Glu, His37Glu, Lys40Glu, Lys48Glu, Arg53Glu, Met66Lys, Asn72Asp, Glu75Lys, His110Lys, Gln115Lys, Ser120Tyr, Ile121Thr, Glu126Lys, Ser128Lys, Gln136Glu, Lys140Glu, Lys153Glu, Lys161Glu, Gln169Glu, Asp183Asn, Lys189Glu, Gln192Glu, Glu270Lys, Asn273Asp, Asn275Asp y Lys277Glu se incorporaron usando el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuickChange Multi (Agilent Technologies) y se confirmó la presencia de mutaciones mediante análisis de secuencia. La disposición espacial de los mutantes se ilustra en la figura 1.

Para el ELISA basado en células, se cultivaron células 293T en placas de 96 pocillos a una densidad de $1x10^5/cm^3$ en DMEM complementado con FCS al 10 % (Invitrogen), aminoácidos no esenciales (Invitrogen), piruvato de sodio (Invitrogen) y L-glutamina 2 mM (Sigma). Las células cultivadas hasta ~80 % de confluencia se transfectaron, usando el reactivo de transfección Lipofectamine-1000 (Invitrogen). Tres días después de la transfección, se fijaron las células con formaldehído al 4 % durante 15 min a temperatura ambiente, después se trataron con H2O2 al 1 %-metanol durante 15 min a temperatura ambiente y se bloquearon con BSA al 3 %-PBS durante 1 hora a 37 °C. Después, se incubaron las células con anticuerpo monoclonal, a 1 µg/ml en PBS con BSA al 1 % (p/v), Tween 20 al 0,05 % (v/v). El ELISA se reveló usando IgGFc anti-ratón secundario conjugado a HRP. La expresión de todas las proteínas HA de H5 mutantes y de tipo silvestre en la superficie de las células 293T se confirmó mediante incubación primaria con antisuero de ratón generado contra el virus Viet04. Todas las mediciones se expresaron como porcentajes de unión a la proteína de control de tipo silvestre. Las mutaciones superficiales se agruparon en sitios antigénicos estructuralmente análogos definidos en la superficie de HA de H3 (A-E) (Wiley y col. (1981) Nature 289, 373) y HA de H1 (Sa, Sb, Ca y Cb) (Gerhard y col. (1981) Nature 290, 713), respectivamente, se agruparon en 5 regiones a lo largo de la superficie de HA de H5, denominadas sitios antigénicos A-E (figura 1).

Ensayos de interferometría de biocapas y de unión

Se usó un instrumento Octet Red (Fortebio, Inc., Menlo Park, CA) para todos los estudios de unión. Los datos se analizaron usando el programa informático del sistema y se exportaron como un archivo de Microsoft Excel para el análisis y la presentación en otros paquetes informáticos. La proteína HA recombinante se inmovilizó en biosensores anti-His a 50-100 µg/ml en tampón de cinética (PBS, pH 7,4, BSA al 0,01 % y Tween 20 al 0,002 %). Para los estudios de especificidad de subtipo, se sondaron los biosensores con Acm a una concentración de 10 µg/ml en cada pocillo. Por comparación, se usaron las moléculas de IgG, Fab y Fab2' de 1A2 y 5C5 que se unían a Viet04 y Anhui05 recombinante, a 5-7 concentraciones diferentes de cada Acm, siendo la mayor concentración de 21 nM. Las etapas basales y de disociación se llevaron a cabo en tampón de cinética 1x.

Ensayo de protección de proteasa

Se adaptó el ensayo de protección de proteasa para 1A2 y 5C5 de los procedimientos de Ekiert y col. (2009) Science 324, 246. En resumen, se mezclaron 20 µg de HA o complejo de Ac Fab-HA con acetato de sodio 100 mM (pH 5,0) o Tris-HCL (pH 8.0) a 37 °C durante una hora. Después se equilibraron las reacciones de incubación a temperatura ambiente y se neutralizó el pH mediante la adición de Tris 200 mM, pH 8,5. Se añadió tripsina (Sigma) a todas las muestras, excepto para los controles, a una relación final de 1:50 en masa para las muestras tanto de complejo como de apo-HA. Las muestras se digirieron durante una noche a 37 °C y se inactivaron mediante la adición de tampón de SDS no reductor seguido de ebullición durante 3 min. Las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE.

Ejemplo 3: Identificación de anticuerpos neutralizantes de clados cruzados

Se produjo un panel de Ac contra virus H5N1 en ratones BALB/c mediante vacunación secuencial con un panel de virus H5 de diferentes clados y linajes (véase el ejemplo 1).

Los anticuerpos generados en estos animales se exploraron respecto de su reactividad cruzada y neutralización mediante ensayos ELISA, de microneutralización (MN) y de inhibición de la hemaglutininación (HI) (véase el ejemplo 2) contra virus H5 de los clados 1 (A/Vietnam/1203/2004; Viet04) y 2.1 (A/Indonesia/05/2005; Indo05) así como un virus H5N2 norteamericano distinto (A/pollo/Nueva Jersey/17169/1993).

Se identificaron doce Ac que poseían actividad de neutralización contra más de un clado H5 (tabla 1). Siete de estos no mostraron actividad HI, lo que indica que los epítopos neutralizantes se encontraban fuera del dominio de unión a

receptor (RBD). También se obtuvieron diez Acm adicionales de fuentes comerciales y colaboradores académicos para los análisis y estos también se presentan en la tabla 1. Todos los Ac que carecían de actividad HI eficiente (<16) mostraron actividad de neutralización (≥64) contra al menos dos clados víricos divergentes.

Tabla 1

Abm	**Isotipo**	**Título de HI (500 µg/ml)**			**Microneutralización (100 µg/ml)**			**Sitio antigénico**	
		Clado 1	Clado 2.1	N.Am	Clado 1	Clado 2.1	N.Am	**H5**	**H1***
6C3[a]	IgG2a	64	<16	<16	1024	<16	32	A	Sa/Sb
1E11[b]	IgGl	128	128	256	>1024	>1024	>1024	A/B	Sa/Sb
5G11[a]	IgGl	128	<16	128	>1024	512	>1024	A/B	Sa/Sb
3B7[b]	IgGl	<16	64	<16	512	>1024	>1024	B	Sa/Sb
6G12[a]	IgG2b	1024	64	1024	>1024	64	>1024	B	Sa/Sb
5G4[a]	IgG2a	<16	<16	<16	512	512	<16	C	Cb
2H8[b]	IgG2a	<16	<16	<16	256	256	256	E/C	Cb
6H10[a]	IgGl	<16	<16	<16	256	256	<16	E/C	Ca/Cb
4D4[b]	IgG2a	<16	<16	<16	256	512	<16	E	Ca
1A2[b]	IgG2a	<16	<16	<16	128	1024	512	E	Ca
5H6[a]	IgG2a	<16	<16	<16	512	>1024	512	E	Ca
7B8[a]	IgG2a	<16	<16	<16	64	64	256	HA2	HA2
16A8.2.3	IgGl	64	<16	64	256	<16	<16	A	Sa/Sb
17A2.1.2	IgG2b	512	512	512	512	>1024	32	A/B	Sa/Sb
21G8.6	IgG2a	256	32	512	256	<16	512	A/B	Sa/Sb
5C5.1.1	IgG2a	512	512	256	>1024	>1024	>1024	A/B	Sa/Sb
16C8.2.7	IgG2a	512	<16	<16	512	<16	<16	B	Sa/Sb
VN04-2	IgG2a	1024	<16	32	>1024	<16	32	A	Sa
VN04-8	IgGl	256	<16	<16	1024	<16	<16	A	Sa
VN04-10	IgG2b	64	128	<16	512	1024	<16	A	Sa

* La ubicación de los epítopos del Acm en relación con los sitios antigénicos identificados en HA de H1 es aproximada.
[a] Acm generados a partir del segundo experimento de vacunación: 1.ª inmunización con Viet04 (clado 1); 2.ª inmunización con A/BHG/Qinghai/12/2005 (clado 2.2); 3.ª inmunización con A/pollo/NJ/17169/1993 H5N2; refuerzo final con HA recombinante de A/egret/Egipto/1162/2006 (clado 2.2).
[b] Acm generados del primer experimento de vacunación: 1.ª inmunización con Indo05 (clado 2.1); 2.ª inmunización con Viet04 (clado 1); refuerzo final con Viet04 (clado 1).

Tabla *1:* Neutralización *in vitro* y mapeo antigénico de anticuerpos neutralizantes anti-H5. Los títulos de HI y MN se indican para las concentraciones de Acm iniciales de 500 µg/ml y 100 µg/ml, respectivamente, con Viet04 (clado 1), Indo05 (clado 2.1) y A/Faisán/Nueva Jersey/4/1993 (H5N2 americano). Se identificaron epítopos sobre la superficie de HA de Viet04 usando un panel de 30 mutantes de HA en 26 posiciones, agrupados en sitios de unión equivalentes a los sitios antigénicos A-E como se indica para los virus H3N2 estacionales (figura 1). Los tres Ac en los que se centra este estudio están resaltados.

Para comprender mejor la distribución e epítopos con neutralización cruzada en HA de H5, se expresó un panel de proteínas HA mutantes que incorporaban cambios individuales o múltiples en restos expuestos en la superficie a lo largo de HA1 en células 293-T y se sondaron para la unión de Acm mediante ELISA basado en células (véase el ejemplo 2) (figura 1).

Se identificaron los epítopos aproximados de 21 Ac en cuatro regiones distintas de HA1 de H5, denominadas sitios de unión A, B, C y E (equivalentes especialmente a los sitios antigénicos para los virus H3N2 estacionales (Otwinowski y col. (1997) Methods in Enzymology 276, 307). Quince Ac se unieron en las proximidades del RBD (sitios de unión A y B) y mostraron reactividad de HI. De los siete Ac que no inhibieron la hemaglutininación, seis se unieron en el dominio de esterasa vestigial de HA1 (sitios de unión C y E) y uno se unió en el dominio de péptido de fusión de HA1/HA2. De forma notable, la mayoría (70 %) de los Ac neutralizantes generados mediante inmunización cruzada con múltiples virus H5 se unieron a sitios antigénicos distintos de A/B (tabla 1). En comparación, los Ac generados mediante vacunación con un solo virus H5 solo se unieron a estos sitios, lo que sugiere que la inmunización cruzada con múltiples clados de virus H5 se centra en el reconocimiento inmunitario en epítopos conservados fuera del RBD en rápida evolución.

Para evaluar el alcance de la conservación de epítopos en distintas regiones de HA de H5, los presentes inventores exploraron Ac contra el sitio A/B (5C5), el sitio C/E (1A2) y el sitio HA2 (7B8) respecto de su reactividad con un panel de HA de H5 seleccionado para candidatos a vacunas en cuatro clados distintos; 1, 2.1, 2.2.1 y 2.3.4 (figura 2). Estos tres Ac se unieron a todas las HA de H5 con alta afinidad, sin embargo, 5C5 mostró reactividad reducida con Anhui05

(clado 2.3.4) y con A/Egipto/N03072/2010 (clado 2.2.1).

7B8 fue el único Ac que reconoció HA de virus de otros subtipos de grupo 1 (H1 y H9) (McCoy y col., (2007) J Appl Crystallogr 40, 658), mientras que las HA del grupo 2 (H3 y H7) no fueron reconocidas. Dicha reactividad heterosubtípica por 7B8 en ausencia de actividad de HI es indicativa de Ac con protección cruzada específicos para el tallo descritos anteriormente. Estos datos indican que 7B8 es un anticuerpo que se une a la región de péptido de fusión de la HA2. Por el contrario, la neutralización de clados cruzados por 5C5 y 1A2 fue específica para virus H5 (figura 2).

Ejemplo 4: Evaluación de la eficacia profiláctica y terapéutica

A continuación, se evaluó la eficacia profiláctica y terapéutica de 1A2, 5C5 y 7B8 contra una infección de otro modo letal del virus Viet04 en un modelo de ratón BALB/c.

Se usaron ratones Balb/c de ocho semanas de edad (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) en todos los experimentos. Para los estudios de eficacia profiláctica y terapéutica, se inoculó a los ratones mediante instilación intranasal de 10 MLD50 de Viet04 en un volumen de 50 µl de PBS por ratón. Nueve grupos de cinco ratones recibieron IgG purificada 1A2, 5C5 o 7B8 mediante inyecciones intraperitoneales -2 h, +24 h o +48 h después de la infección a una dosis de 10 mg kg-1 de peso corporal en 0,5 ml de PBS. Un grupo de ratones recibió una inyección IP de 0,5 ml de PBS. Se pesó a diario a los ratones y se observaron los signos clínicos de infección durante 14 días después de la infección. Se puntuó a los ratones basándose en los signos clínicos, incluyendo pelaje rizado, movimiento reducido, postura encorvada y enfermedad neurológica. El peso corporal se usó como criterio de valoración clínico y se sacrificó a los ratones con una pérdida de peso corporal ≥25 % de los valores antes de la infección. Los estudios con animales se llevaron a cabo según los protocolos aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales. Todos los experimentos usando virus de la gripe aviar altamente patógenos de subtipo H5N1 se llevaron a cabo en instalaciones de contención animal de nivel 3 de bioseguridad que incluían mejoras requeridas por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos y el Programa de Agentes Seleccionados.

Los tres Ac proporcionaron protección tanto profiláctica (figura 3A) como terapéutica (supervivencia del 80-100 %) (figura 3B/C), mostrando todos los ratones supervivientes ausencia de signos clínicos durante 14 días después de la inoculación, mientras que todos los ratones sin tratar alcanzaron el criterio de valoración de terminación en el día 11. Ambos anticuerpos, 5C5 y 1A2, proporcionaron protección completa, mientras que 7B8 proporcionó protección parcial (80 % en los grupos tratados 2 antes y 48 h después de la incubación), con una proporción aumentada de animales que mostraron signos clínicos de enfermedad (datos no mostrados). Estos datos, junto con los presentes datos de MN *in vitro*, indican que la eficacia protectora de los Ac se correlacionó positivamente con la distancia de los epítopos del Ac de la membrana vírica, de tal forma que los anticuerpos se unieron a epítopos altamente expuestos en la parte superior de HA proporcionaron la protección más eficaz.

Tabla 2: Signos clínicos de enfermedad para el estudio de eficacia protectora de los Acn 1A2, 5C5 y 7B8 contra la exposición a virus Viet04 de tipo silvestre.

Acn	Punto de tiempo	Pelaje rizado	Movilidad reducida	Postura encorvada	Enfermedad neurológica
5C5	2 h	0/5	0/5	0/5	0/5
	24 h	0/5	0/5	0/5	0/5
	48 h	5/5	1/5	1/5	0/5
1A2	2 h	0/5	0/5	0/5	0/5
	24 h	0/5	0/5	0/5	0/5
	48 h	0/5	0/5	0/5	0/5
7B8	2 h	1/5	0/5	1/5	0/5
	24 h	1/5	0/5	0/5	0/5
	48 h	5/5	1/5	1/5	0/5
PBS	Todos	5/5	5/5	5/5	0/5

Ejemplo 5: Secuenciación de las cadenas H y L de IgG.

Se determinó la secuencia de aminoácidos de los dominios variables y constantes (C1) de la cadena pesada (H) y ligera (L) de inmunoglobulina de 1A2 y 7B8 mediante PCR de transcriptasa inversa o ARNm extraído de las células de hibridoma 1A2. Se usaron cebadores comercialmente disponibles, diseñados para la amplificación de los genes variables de cadena pesada y ligera de IgG (Novagen), para amplificar el ARNm purificado y la secuencia de aminoácidos de cada gen se determinó secuenciando el ADNc resultante.

Ejemplo 6: Análisis de conservación entre subtipos de HA.

Se generaron alineamientos de secuencias de proteínas a partir de la base de datos GISAID EpiFlu™ para todas las secuencias de hemaglutinina HA1 de H5 (1997-2011), H1 estacional (2000-2011) y H3 (2000-2011). La conservación en cada posición de HA1 se calculó usando el editor de alineamiento de secuencias Bioedit {Hall, 1999 n.º 114}. Los resultados se procesaron en Microsoft Excel y una puntuación de conservación >99 % se consideró una posición

conservada. La conservación entre los restos de superficie se ilustró colorando representaciones de la superficie molecular de HA de H5, H1 y H3, respectivamente. Los modelos moleculares se generaron en Swiss Model (Arnold y col. (2006) Bioinformatics 22, 195) y las figuras se generaron usando PYMOL (Delano (2002) http: //www. pymol. org).

Ejemplo 7: Estudios de cristalización

Para definir con precisión los epítopos de 5C5 y 1A2, se determinaron las estructuras cristalinas de los Fab tanto 5C5 como 1A2 en complejo con HA de H5 de Viet04.

Preparación de Fab y Fab2'

La IgG purificada se digirió en fragmentos Fab y Fc mediante exposición a 40 µg de proteasa papaína activada (Sigma)/mg de IgG, en una solución que contiene cisteína 10 mM, acetato de sodio 100 mM a pH 5,5, EDTA 125 µM durante 2-4 h a 37 °C. El Fab2' se produjo mediante digestión con proteasa pepsina (Sigma) durante 2-4 h a 37 °C. Los fragmentos Fab y Fab2' se purificaron posteriormente a partir de Fc mediante cromatografía de afinidad usando una columna de proteína A Hi-trap (GE Healthcare) y se purificaron hasta homogeneidad mediante cromatografía de filtración en gel de exclusión por tamaños (Superdex 75 10/30; GE Healthcare).

Formación y purificación de los complejos de 5C5 Fab/HA y 1A2 Fab/HA

Se mezclaron el Fab 5C5 y el Fab 1A2 con trímeros de HA recombinante de Viet04 purificados, con el marcador his eliminado a una relación molar de 5 partes de Fab por 1 parte de Ha, para asegurar la saturación con Fab. Los complejos de 5C5 Fab-HA de Viet04 (5C5/HA) y 1A2 Fab-Viet04 (1A2/HA) resultantes se purificaron de los sustratos no unidos mediante cromatografía de filtración en gel de exclusión por tamaños (columna Superdex 200 10/30; GE Healthcare) en un tampón que comprendía Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), NaCl 150 mM. 5C5/HA y 1A2 HA eluyeron como picos individuales entre los marcadores de peso molecular de 158 kDa y 670 kDa y se concentró hasta 15 mg/ml.

Cristalización y determinación de la estructura del complejo 5C5/HA

La exploración inicial de cristalización de matriz difusa se llevó a cabo usando un sistema de cristalizador de difusión de interfaz libre (FID) TopazTM (Fluidigm Corporation, San Francisco, CA). Los aciertos se obtuvieron después de 24 horas en varias condiciones que contenían el agente de precipitación PEG 4.000. Después de la optimización, se obtuvieron cristales con calidad de difracción a 23 °C, usando el procedimiento de difusión por lote de vapor bajo una capa de aceite (que comprende 6 partes de aceite de parafina/4 partes de aceite de silicona) en gotas de 1,0 µl que contenían 5C5/HA en PEG 4.000 al 9 %, tartrato de amonio 300 mM, NaCl 5 mM, Tris 25 mM (pH 8,0). El conjunto de datos del complejo 5C5 Fab-HA se recogió de un solo cristal a una resolución de 3,36 Å en la línea de haz Ser CAT 22-ID de un dispositivo Advanced Photon Source (APS). 5C5 Fab-HA cristalizó en el grupo de espacio cúbico 1213. La recogida de datos y las estadísticas de refinado se presentan en la tabla 3.

Tabla 3 Recogida de datos cristalográficos y estadísticas de refinado para las estructuras cristalinas de 5C5/H5 y 1A2/H5.

	Complejo 1A2/H5 HA	**Complejo 5C5/H5 HA**
A. *Procesado de datos*		
Grupo espacial	*R* 32	$I2_13$
Dimensiones de la celda	a = b = 141,2 Å, c = 401,2 Å (α = β = 90°, γ = 120°)	a = b = c = 219,88 Å (α = β = γ, = 90°)
Intervalo de resolución (Å)	50,00 - 2,60 (2,64 - 2,60)	50,00 - 3,36 (3,42-3,36)
Completitud (%)	99,5 (99,5)	98,5 (99,6)
Redundancia	3,1 (3,1)	4,1 (4)
R_{sim}[a] o R_{solap} (%)	6,7 (61,6)	13,4 (74,6)
I/σ (I)	22,4 (1,8)	10,6 (1,7)
B. *Refinamiento*		
Reflexiones (total)	45.261 (3.330)	23.670 (1.767)
Reflexiones (prueba)	2.412	1.277

(continuación)

	Complejo 1A2/H5 HA	**Complejo 5C5/H5 HA**
R_{crist}[b] / R_{libre}[c] (%)	22,6 / 26,1	23,0 / 27,0
Restos / átomos de proteína	1.064 / 7.484	912 / 7.269
Error de coordenada[c] (Å)	0,25	0,42
rmsd - longitudes de enlace (Å)	0,006	0,008
rmsd - ángulo de enlace (°)	0,9	1,2
Valor B de Wilson (Å^2)	66,7	74,9
Valor B medio (Å^2)	81,67	74,72
Waters	135	0
Átomos de carbohidratos	116	115
Estadísticas de Ramachandran más favorecidas (%)	95,4	94,2

Permitido (%)	99,9	100
No permitido (%)	0,1	0

[a] Los valores entre paréntesis son para la corteza de mayor resolución.
[b] $R_{sym} = 100\sum_h\sum_i|I_i(h) - \langle I(h)\rangle|/\sum_h I(h)$, en la que I_i es la *i*ésima medición de la reflexión *h* y $\langle I(h)\rangle$ es el valor medio de la intensidad de reflexión.

[c] $R_{crist} = \sum|F_o| - |F_c|/\sum|F_o|$, en la que F_o y F_c son las amplitudes del factor de estructura para los datos experimentales y del modelo calculado, respectivamente.
[d] R_{libre} es R_{crist} con un 5% de los factores de estructura del conjunto de prueba.
[e] Los valores están basados en la máxima probabilidad

Los datos se procesaron y escalaron usando HKL2000 y Denzo (Otwinowski y col. (1997) Methods in Enzymology 276, 307). Se determinó la estructura del complejo 5C5 Fab-HA mediante el procedimiento de reemplazo molecular usando Phaser (McCoy y col. (2007) J Appl Crystallogr 40, 658). Se obtuvo una solución fuerte para el componente HA del complejo usando un solo monómero de HA de Viet04 (cadenas A y B de PDB: 2FK0 (Stevens y col. (2006) Science 312, 404). Una búsqueda inicial para 5C5 Fab determinó la posición de los dominios variables (Fv) usando el componente Fv de un Fab de IgG1 de ratón (PDB: 1WEJ (Mylvaganam y col. (1998) J Mol Biol 281, 301) como modelo de búsqueda. Una búsqueda posterior usando los dominios constantes (Fc) de un Fab de IgG2 de ratón (PDB: 3F09 (Zhu y col., (2009) J Am Chem Soc 131, 18206) localizó la región Fc.

El cuerpo rígido y el refinamiento restringido de la solución de reemplazo molecular se llevó a cabo usando REFMAC5 (Murshudov y col. (1997) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 53, 240) y la construcción del modelo se llevó a cabo en Coot (Emsley, Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 66, 486). La densidad electrónica de 2Fo-Fc estaba bien definida por todo el modelo. De forma notable, los restos 79-85 de HA1 adoptaron una conformación diferente a aquellos en la estructura de apo-H5 HA. Se observó una densidad electrónica positiva adicional en la región de 3 sitios de glucosilación unidos a N potenciales. Se ajustaron manualmente nueve restos de azúcar en esta densidad en estas posiciones. El refinado restringido de la estructura se completó en REFMAC5.

Cristalización y determinación de la estructura del complejo 1A2 Fab-H5

Se formó un solo cristal del complejo 1A2/HA a lo largo de un periodo de 5 semanas en una gota en reposo que contenía 15 mg/ml de 1A2/HA en acetato de amonio 100 mM, citrato de sodio 50 mM, pH 5,6, 2-metil-2-4-penteno-diol (MPD) al 15 %, NaCl 5 mM, Tris 25 mM, pH 8,0 a 23 °C. Después de optimizar mediante la siembra en estrías de este cristal en gotas que contenían concentraciones crecientes de MPD, se produjeron cristales con calidad de difracción con morfología romboédrica mediante siembra en estrías en gotas en reposo con un volumen de 1 µl que contenían 15 mg/ml de 1A2/HA en acetato de amonio 100 mM, citrato de sodio 50 mM, pH 5,6, MPD al 18 %, NaCl 5 mM, Tris-HCl 25 mM, pH 8,0 a 23 °C. El conjunto de datos del complejo 1A2/HA se recogió de un solo cristal a una resolución de 2,6 Å en la línea de haz Ser CAT 22-ID de un dispositivo Advanced Photon Source (APS). 1A2 Fab-HA cristalizó en el grupo de espacio romboédrico R32. La recogida de datos y las estadísticas de refinado se presentan en la tabla 1.

Los datos se procesaron y escalaron usando HKL2000 y Denzo y se determinó la estructura del complejo 1A2/HA mediante el procedimiento de reemplazo molecular usando un solo monómero de HA de Viet04 (cadenas A y B de PDB: 2FK0) y un Fab de IgG2 (PDB: 3DGG (Nettleship y col. (2008) Protein Expr Purif 62, 83) como modelos de búsqueda. Las rondas posteriores de refinado de cuerpo rígido usando REFMAC5 identificaron regiones de bucle en el modelo de búsqueda de MR (varios bucles por debajo del dominio de esterasa vestigial de HA1, así como un solo bucle en la hebra B de HA2) que adoptó una orientación diferente en el mapa de densidad electrónica de 2Fo-Fc. El posterior reemplazo molecular usando la HA de Viet04 de una estructura de complejo con anticuerpo (cadenas A y B de PDB: 3GBN (Ekiert y col. (2009) Science 324, 246)), en la que estos bucles adoptan una conformación alternativa a aquella en 2FK0, identificó una solución que se refinó para mostrar la densidad electrónica de 2Fo-Fc bien definida a lo largo de los componentes de HA y Fv de 1A2 del modelo y claramente resolvió elementos que interactuaron dentro del sitio de peinado de 1A2. El reemplazo molecular de los dominios Fc de 1A2 usando el componente Fc de PDB: 3BBG proporcionó una solución que se empaquetó y mostró una densidad electrónica de 2Fo-Fc claramente definida a lo largo de la mayor parte de la cadena pesada de Fc y parte de la cadena ligera de Fc, que irrumpe en la densidad que rodea a las regiones en las hebras C, D, E, F y G. Las posteriores rondas de refinado de cuerpo rígido y restringido en REFMAC no lograron mejorar la calidad de la densidad electrónica en los dominios constantes de 1A2. Las cadenas tanto pesadas como ligeras mostraron una definición reducida en la calidad de la densidad electrónica de 2Fo-Fc, así como valores B aumentados a lo largo de los dominios carboxilo-terminales del Fab, que indican un desorden sustancial en esta región del complejo. La estructura de la HA de H5 fue esencialmente la misma que la de apo-H5 HA usada como modelo de búsqueda. El refinamiento de TLS restringido se llevó a cabo usando REFMAC5 y la construcción del modelo se llevó a cabo usando Coot. Se construyeron en el modelo cuatro restos de carbohidratos adicionales, 135 moléculas de agua y 2 moléculas de MPD usando Coot.

Validación y análisis de datos estructurales

Los restos se numeraron en la HA de H5 de ambos complejos de acuerdo con la HA de H5 madura. Los restos en los

Fab 1A2 y 5C5 se numeraron de acuerdo con el sistema de numeración de Kabbat y Wu. La validación estructural se llevó a cabo usando Molprobity (Davis y col. (2007) Nucleic Acids Res 35, W375) y Procheck así como el servidor de validación de PDV RCSB. La conectividad y nomenclatura de restos de carbohidratos se validó usando PDBCARE (Glycosciences.de). Las manipulaciones del modelo, los cálculos de RMSD y las mediciones de distancias se llevaron a cabo usando Coot y Pymol (Delano 2002, http: //www.pymol.org). Los cálculos de área superficial accesible al disolvente se llevaron a cabo usando PISA (http: //www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/pistart. html) (Krissinel (2007) J Mol Biol 372, 774) y Protorp (http://www.bioinformatics.sussex.ac.uk/protorp/info.html) (Reynolds y col. (2009) Bioinformatics 25, 413). Las imágenes se generaron usando Pymol.

Ejemplo 8: Análisis de las estructuras cristalina de los complejos 5C5 Fab-HA y 1A2 Fab-HA

Las estructuras de los complejos 5C5/HA y 1A2/HA comprenden tres Fab unidos a un solo trímero de HA (figura 4), estando ambos epítopos de anticuerpo ubicados en el dominio globular de HA1, aunque en distintas ubicaciones (figura 5). La densidad electrónica de $2F_o$-F_c está bien definida a lo largo del componente HA de ambas estructuras, que comprenden los restos 1-321 (HA1) / 4-175 (HA2) y 1-321 (HA1) / 1-176 (HA2) del ectodominio de HA de H5 madura en los complejos de 5C5 Fab-HA y 1A2 Fab-H5, respectivamente. Los sitios de combinación de anticuerpo y los dominios variables de Fab están bien definidos en los mapas de densidad electrónica de $2F_o$-F_c de ambos complejos, sin embargo, los dominios constante de 1A2 Fab están parcialmente desordenados y muestran una densidad electrónica mal definida, como se observa en otras estructuras de complejo de Fab (Ekiert y col., 2009 Science 324, 246). Los componentes de ectodominio de HA de H5 de ambos complejos son altamente similares a la estructura de HA de H5 no complejada (Stevens y col. (2006) Science 312, 404) y la interacción con Ac no produce grandes cambios en la estructura de la forma HA1/HA2 del monómero, ni tampoco afecta a la asociación de monómeros en el trímero de ectodominio.

La resolución relativamente modesta de la estructura del complejo 5C5 Fab-HA (3,36 Å) previene el análisis detallado de las interacciones moleculares en la interfaz, sin embargo, las características generales del sitio de combinación de 5C5 están bien definidas en el mapa de densidad electrónica de $2F_o$-F_c y puede interpretarse el modelo de manera fiable en vista de las estructuras de alta resolución usadas para el reemplazo molecular de HA de H5 y 5C5 Fab. La huella de HA de H5 enterrados por la interacción de 5C5 comprende 29 restos, incluyendo componentes de las tres características altamente conservadas de los RBD de HA, la hélice 190 (Ala185- Glu187), el bucle 130 (Gly130 - Ser133) y el bucle 220 (Lys218 - Ser223). La interfaz también incluye restos estructuralmente equivalentes a los sitios antigénicos A y B de los virus H3N2 que bordean al sitio de unión a ácido siálico, que incluyen Glu126, Ser128 y Lys140 (sitio antigénico A), así como Lys152 y Lys189 (sitio antigénico B). La superposición de un resto de ácido siálico unido en el sitio de unión a receptor de H5 demuestra la oclusión completa del sitio de unión mediante la interacción con 5C5 (figura 4B). La interfaz de 5C5 entierra un área superficial accesible al disolvente de aproximadamente 1.686 $Å^2$ (861 $Å^2$ en 5C5 y 825 $Å^2$ en H5), aportando tanto la cadena pesada variable (VH) como la cadena ligera variable (VL) de inmunoglobulina aproximadamente un 50 % del área enterrada tras la interacción. En este sentido, la interfaz puede dividirse en dos partes iguales, mediadas por contactos con la VH y la VL, respectivamente, con restos que entran en contacto con la VH en el bolsillo de unión a ácido siálico y restos que entran en contacto con la VL en el sitio antigénico A, así como el bucle 130 (figura 4B).

Las interacciones que implican la VH de 5C5 están dominadas por la región determinante de la complementariedad (CDR) H3, que forma contactos extensos con restos en el surco de unión a ácido siálico conservado. La cadena lateral de AlaH98 forma enlaces de hidrógeno con Gln222 y las cadenas laterales de TyrH99 y TyrH100a se extienden hacia el suelo de la cavidad de unión a ácido siálico, entrando en contacto con Trp149 y formando enlaces de hidrógeno con Tyr91, así como Glu186. Tyr91 también se extiende hacia la cavidad del sitio de unión, formando enlaces de hidrógeno con Asp183 y Glu186. Los contactos con ThrH30-TyrH32 en el bucle de CDR H1 y GluH53 en el bucle CDR H3 forman el límite de la interfaz, mediada por enlaces de hidrógeno entre la cadena lateral extendida de Lys218 de Viet04 con SerH32 y GluH53.

La interfaz formada con VL está dominada por contactos en CDR L2, que forma interacciones extensas con restos en el bucle 130. Los enlaces de hidrógeno entre ThrL52, AsnL53 y LeuL54, en el límite del epítopo, con Lys152, Asn154 y Ser155, así como TyrL49 con Lys189 representan la mayoría del área superficial enterrada, mientras que se forman contactos adicionales entre TrpL92 y GlyL93 en CDRL3 con Lys140 y Ser141. Las cadenas laterales de Glu126 y Leu129 se insertan en la cavidad poco profunda formada por la interfaz VH/VL, bordeadas por HisL32 y TyrH100a. El epítopo de 5C5 contiene cuatro restos (Lys152-Ser155) dentro del equivalente de Sa, cinco restos (Asp183-Glu186, Lys189-Leu190) dentro del equivalente de Sb y tres restos (Lys140, Ser141 y Gly221) dentro de los sitios equivalentes de Ca de los virus H1 estacionales (véase la figura 6).

La huella del epítopo de 1A2 en la HA se representa en la figura 4d e incluye 30 restos, que comprende los tres restos ubicados en el sitio antigénico D y 4 de los 6 restos en el sitio antigénico E de la presente exploración de mutagénesis (véase la figura 1, tabla 4).

Sitio antigénico	Mutantes	1A2	5C5/1.1
	Wt HA	100	100
sitio A	★Q115K	101	100
	S120Y	103	108
	☆E126K	94	89
	☆E126K, S128K	104	105
	☆Q136E, K140E	102	97
sitio B	☆K153E, Q192E	107	94
	☆K189E	116	44
	☆K161E, D183N	103	118
	K161E	107	117
	☆D183N	111	113
sitio A/B	K140E, K189E	113	2
sitio A/D	★I114T, Q115K	86	102
sitio A/E	Q138E, M66K	105	102
sitio D/E	Q169E, K259E	94	99
sitio E	★K48E	81	104
	★R53E	116	105
	M66K	119	104
	R53E, M66K	117	88
	★N72D	67	107
	★E75K	107	97
	K259E	112	102
sitio C	K36E	102	97
	H37E	97	101
	★K40E	98	102
	E270K	104	107
	★N273D	96	105
	N275D, K277E	122	108
sitio D	★H110K	99	104
	★I114T	89	103
	★Q169E	89	111
Sitio de unión	Q222L, G224S	94	104

Tabla 4: Mutagénesis de HA de H5 de Viet04 para ubicar los epítopos de Ac en uno de los cinco sitios antigénicos (A-E) en HA1 (véase la figura 1). La unión de los Ac a HA de H5 mutante se puntuó como un % de la unión a la proteína TS de Viet04. Las mutaciones que redujeron la unión del Ac por debajo del 85 % de HA de TS (resaltadas en naranja) se consideraron significativas a efectos de la identificación de epítopos. Los datos de unión se adquirieron mediante ELISA basado en células, como se describe en los procedimientos. Las mutaciones en los restos en los epítopos de los Ac 1A2 y 5C5, determinadas en las estructuras cristalinas de 1A2/H5 y 5C5/H5, se indican por una estrella hueca y rellena, respectivamente.

La interfaz abarca una distancia de prácticamente 40 Å desde Thr167 hasta Asn273 en la base del dominio vestigial de esterasa y entierra una gran área superficial accesible al disolvente de aprox. 2.046,8 $Å^2$, en comparación con aprox. 1.500 $Å^2$ comúnmente observada para las interacciones de proteína-anticuerpo (Wilson y Stanfield (1994) Curr Opin Struct Biol 4, 857). El epítopo es conformacional, comprendiendo la lámina β His110-Ile116, tres regiones de bucle (Gly46-Arg53, Asp68-Glu75 y Thr167-Glu170), así como Asp43, Tyr164, Tyr 271 y Asn273. La interfaz se coordina principalmente mediante contactos con restos polares, que implican 13 enlaces de hidrógeno, 4 de los cuales están mediados por moléculas de agua puenteantes.

Los seis bucles de región determinante de la complementariedad (CDR) de 1A2 Fab están implicadas en la interacción, así como los restos dentro de la región marco conservada 3 de la cadena ligera de inmunoglobulina (FRL3), con la mayoría del área superficial enterrada (60 %) mediada por restos dentro de la cadena pesada de Fab (VH). Tres restos polares en HA1, Asn72, Glu112 y Gln169, representan prácticamente un 30 % del área superficial dentro de la interfaz y median 6 de los 13 enlaces de hidrógeno intermoleculares. La interacción con CDR L3 está limitada a contactos con únicamente un solo resto, TyrL90, que forma el techo de una pequeña cavidad entre las cadenas pesada y ligera de 1A2 bordeada por AsnL32, TyrL49, SerL50 y AsnH100, en la que se insertan las cadenas laterales de Glu112 y Lys255. La cadena lateral orientada hacia el exterior de Asn72 se encuentra en el centro del epítopo de 1A2 y se encuentra directamente dentro del giro formado en la punta de la estructura en horquilla de CDRH3 para formar enlaces de hidrógeno con GlyH96 y GlyH99. Asn168, Gln169 y Glu170 forman contactos con SerL50 y HisL53 en la CDR L2, GluL66 y GlyL68 en la FRL3 y GlyL30 y AsnL32 en la CDRL1, respectivamente. El epítopo de 1A2 incluye cinco restos (Ile71-Glu75) equivalentes al sitio antigénico Cb, así como tres restos (Thr167-Gln169) equivalentes a Ca (véase la figura 6).

<u>Comparación de HA de H5 de los complejos 1A2 Fab-H5 y 5C5 Fab-H5</u>

La similitud en la topología general de la HA de H5 de las estructuras de complejo con 5C5 y 1A2 y la HA no complejada de A/Vietnam/1203/04 (PDBID 2FK0) implica que la interacción con 1A2 y 5C5 no induce grandes cambios estructurales en la HA1/HA2 *per se*. Sin embargo, H5 del complejo con 1A2 muestra una conformación diferente en Asn60 - Gly67 en la hebra B de HA2. Este bucle está desplazado por 6 Å hacia el núcleo helicoidal del dominio HA2. Este desplazamiento va acompañado por un desplazamiento en la posición de los bucles que comprenden los restos 270 - 306 de HA1, ubicados por debajo del dominio vestigial de esterasa; el epítopo de 1A2 está ubicado directamente por encima de esta región. Los contactos de la red cristalina y/o las interacciones de anticuerpo que se producen dentro o alrededor de esta región de HA1 pueden ser responsables de un movimiento hacia afuera en los restos 270-306, que se transmite hacia el núcleo helicoidal de HA2 a través de Ile299-Glu301. Los factores de temperatura (B) para estos restos no son mayores que el valor medio para las estructuras respectivas y la conformación adoptada es

común para todos los monómeros HA1/HA2 en un trímero.

Se ha informado con anterioridad de cuatro estructuras de HA de virus H5N1, tanto en forma no complejada (Stevens y col. (2006) Science 312, 404; Russell y col. (2006) Nature 443, 45), así como en complejo con Fab de Ac (Ekiert y col. (2009) Science 324, 246; Sui y col. (2009) Nat Struct Mol Biol 16, 265). La estructura cristalina de una apo-H5 HA de un virus aviar (A/Pato/Singapore/3/1997) (PDB: 1JSM) también se ha descrito (Barbey-Martin y col. (2002) Virology 294, 70). El alineamiento de las cinco estructuras de H5 existentes con el componente de H5 de las estructuras de complejo con 5C5 y 1A2 indica que las siete estructuras tienen una topología general altamente similar en el dominio de unión a receptor, así como en las regiones proximales de membrana de HA1 y HA2. Sin embargo, las siete estructuras de HA de H5 muestran una de las dos conformaciones distintas en los bucles que comprenden los restos Asn60 - Gly67 en la hebra B de HA2, lo que sugiere que estos restos no son inherentemente flexibles, pero adoptan una de dos conformaciones distintas. El significado de esta dicotomía conformacional, que es independiente del pH de cristalización, sigue sin estar claro y queda a la espera de investigaciones adicionales. Con respecto a esta distinción en HA2, la presente estructura de complejo de 1A2, cristalizada a pH 5,6, es más similar a la estructura no complejada de A/Vietnam/1194/04 cristalizada a pH 6,5 (PDB: 2IBX) y la H5 de A/Vietnam/1203/04, cristalizada a pH 6,0 (PDB: 3GBM) en complejo con un Fab de Acn que impide el proceso de fusión a la membrana. La HA del presente complejo con 5C5, cristalizada a pH 8,0, es más similar a la estructura no complejada de A/Vietnam/1203/04 cristalizada a pH 6,6 (PDB: 2FK0) y el ectodominio de Viet04 cristalizado a pH 8,5 (PDB: 3FKU) en complejo con un Fab de Acn que impide el proceso de fusión a la membrana. Los valores de RMSD para la superposición de HA de H5 de los complejos 1A2/HA y 5C5/HA es de 1,92 Å para los 485 átomos de Cα (314/171 en HA1/HA2, respectivamente). Los valores de RMSD se calcularon usando un algoritmo de mínimos cuadrados, implementado en Coot. De las estructuras de HA de H5N1 preexistentes, H5 del complejo con 1A2 tiene el mayor grado de complementariedad con el ectodominio de HA de H5 cristalizado a pH 6,5 (PDB: 2IBX). En cambio, H5 del complejo de 5C5, cristalizada a pH 8,0, muestra una mayor complementariedad estructural con los ectodominios de H5 cristalizados a pH 8,0 (PDB: 2FK0) y a pH 8,5 (PDB: 3IBX). El alineamiento revela sutiles diferencias estructurales dentro de las regiones de bucle en la base de la estructura de lámina beta de ocho hebras de HA1. Cabe destacar que, Asn60-Gly67 en la hebra B de HA2 está desplazado hacia la hebra C de HA2 y el núcleo a-helicoidal del trímero en aquellas estructuras cristalizadas a o menos de pH 6,5 en relación con aquellas cristalizadas a pH neutro. Este desplazamiento va acompañado de un cambio en el bucle que comprende 270-306 de HA1 que induce un cambio sutil en la posición de los bucles en esta región de HA1, lo que sugiere una variación asociada con el pH entre los dominios HA1 y HA2. En este sentido, es posible que los efectos neutralizantes de los anticuerpos que se unen al sitio antigénico E se deban en parte a la estabilización del complejo HA1/HA2 antes de la fusión.

Mecanismo de neutralización por 1A2 y 5C5

La separación espacial de los epítopos de 1A2 y 5C5, la MN y los datos de HI implican neutralización por distintos mecanismos. La unión de 5C5 al sitio de unión de ácido siálico inhibe la interacción con receptores del hospedador, impidiendo la unión vírica a la célula hospedadora. Este es el mecanismo de neutralización predominante para los Acn que se unen a los sitios antigénicos Ca, Cb y Sa en los virus H1N1 (A y B en los virus H3N2). Dichos Acm se han caracterizado estructuralmente con anterioridad en complejo con HA de virus H3 (Bizebard y col. (1995) Nature 376, 92) así como H1 (Xu y col. (2010), Science 328, 357; Whittle y col. (2011) Proc Natl Acad Sci USA). El mecanismo de neutralización por 1A2 es menos claro. Ubicado dentro del dominio vestigial de esterasa a una distancia del sitio de unión a ácido siálico, el resto más próximo en el Fab 1A2 (AsnH97) se encuentra a aproximadamente 22 Å de distancia de un resto de ácido siálico modelado dentro del sitio de unión a receptor. Los presentes datos estructurales demuestran el bloqueo estérico de la unión del receptor de HA por 1A2 no se produce en el contexto del Fab solo y podría producirse únicamente mediante la oclusión indirecta del RBD por la IgG o el Fab2 de 1A2 intacto. Además, la actividad de neutralización basada en la inhibición de la unión a receptor por 1A2 ha de producirse de manera independiente a la requerida por HI (tabla 1). Los Ac que no bloquean la función de unión a receptor de HA provocan neutralización por la inhibición de la conversión dependiente de pH de HA de H5 de la forma antes de la fusión a la forma después de la fusión (Sui y col. (2009) Nat Struct Mol Biol 16, 265; Barbey-Martin y col. (2002) Virology 294, 70; Okuno (1993) J Virol 67, 2552; Throsby y col. (2008) PLoS One 3, e3942). Sin embargo, 1A2 no impide este cambio conformacional dependiente del pH (figura 7E). Para probar el mecanismo de neutralización por 1A2 se produjeron fragmentos Fab y Fab2' de 1A2 y 5C5, para ensayos de HI y MN. La medición de las cinéticas de las interacciones usando interferometría de biocapas confirmó que las tres especies de ambos Acn se unieron a HA recombinante con afinidades nanomolares (figura 7C, D). Los ensayos de HI usando un panel de virus H5 de diversos linajes indicaron que, a diferencia de 5C5, la interacción con 1A2 no prohíbe la aglutinación de los glóbulos rojos, lo que es coherente con la noción de que los Acn que se unen al sitio antigénico E no inhiben la función de unión a ácido siálico de HA *per se* (figura 7A). Los ensayos de MN usando múltiples clados de virus H5 demostraron que tanto la IgG como el Fab2' de 1A2 generan neutralización, mientras que el Fab de 1A2 no (figura 7B). Por lo tanto, la actividad de neutralización se asocia o bien con la naturaleza bivalente de la interacción de virus-anticuerpo o con el mayor tamaño de IgG/Fab2' en relación con el Fab. De forma notable, la IgG intacta (~150 kDa) neutralizó la infectividad a una concentración menor que el Fab2' más pequeño (-100 kDa), que a su vez fue más eficiente que el Fab (-50 kDa), lo que indica que el tamaño molecular es significativo para el proceso de neutralización. Por lo tanto, el mecanismo de neutralización por 1A2 se debe probablemente a la inhibición de la unión vírica por el bloqueo estérico de la función de unión a receptor de trímeros de HA adyacentes, de tal forma que los anticuerpos unidos a HA en la superficie vírica inhiben la unión a receptor de los trímeros HA próximos, debido al tamaño relativamente grande del anticuerpo o Fab2' 1A2. Los

estudios previos, que examinaron las características estructurales y de unión de los anticuerpos neutralizantes que interactuaron con una región equivalente de la HA de H3, dieron lugar a las mismas conclusiones respecto al mecanismo de neutralización por estos anticuerpos, basándose en las mediciones de afinidad y avidez de las interacciones de IgG y Fab *in vitro* (Fleury y col. (1999) Nat Struct Biol 6, 530; Fleury y col. (2000) Proteins 40, 572; Knossow y col. (2002) Virology 302, 294).

En la actualidad, la variación antigénica entre los virus de la gripe después de una circulación sostenida entre humanos solo está bien establecida en el contexto de las cepas H1 y H3. Las comparaciones de HA de H5 con la HA de H1 estructuralmente homóloga indica que los epítopos tanto de 5C5 como de 1A2 comprenden regiones equivalentes a sitios antigénicos altamente variables en HA de H1 (figura 6). Por lo tanto, ambos epítopos pueden estar sometidos a una mayor presión selectiva en el contexto de un virus H5 pandémico en caso de que la variabilidad antigénica entre los virus H1 pueda traducirse a posiciones estructuralmente equivalentes de virus H5 tras una circulación sostenida entre humanos. Sin embargo, los presentes datos demostraron que ambos Ac neutralizaron múltiples clados de virus H5 *in vitro* y proporcionaron una protección profiláctica y terapéutica completa contra la infección por Viet04 *in vivo*, indicando la eficacia de estos Ac contra virus HPAI contemporáneos.

En resumen, 5C5 se une directamente sobre el RBD (figura 4A) y su epítopo comprende componentes de todos los elementos canónicos del sitio de unión a ácido siálico (RBS), incluyendo el bucle 130, el bucle 220, la hélice alfa 180, así como el bucle 150 cercano. El epítopo está restringido a un solo monómero de HA y está inmediatamente adyacente al sitio de N-glucosilación en Asn154 (figura 4B). 1A2 se une a más distancia del RBD (figura 4C) y abarca la estructura de lámina beta en la base del dominio de esterasa vestigial (figura 4D). Ambos epítopos están restringidos al HA1 y son espacialmente distintos de los de 7B8, que también comprende HA2. Los restos en los epítopos 5C5 y 1A2 se encuentran conservados entre virus H5 geográfica y temporalmente diversos (figura 8).

Los epítopos de 5C5 y 1A2 definen dos nuevos parches de superficie conservados entre virus H5 contemporáneos. Ambos Ac exhiben actividad neutralizante en presencia de múltiples sustituciones de restos dentro de estos epítopos (figura 8), demostrando capacidad para tolerar mutaciones.

La mutagénesis de HA1 de H5 identificó sustituciones de aminoácidos individuales que podrían alterar las interacciones de 5C5 o 1A2 *in vitro* (tabla 4, figura 1), aunque no está claro si dichos cambios sustanciales en la topología y la carga podrían ser permisibles *in vivo*, particularmente en el componente de RBS del epítopo de 5C5. Además, una variación dramática en el tamaño y la carga de cinco restos en la periferia del epítopo de 5C5 y ocho restos dentro del epítopo de 1A2 (tabla 4) no afectaron negativamente a las interacciones de Ac, lo que es coherente con los contactos intermoleculares limitados formados por estos restos. Por lo tanto, el reconocimiento de múltiples clados de virus H5 por 5C5 y 1A2 refleja la conservación entre los elementos críticos de ambos epítopos, emparejada con la tolerancia para sustituciones de restos entre los componentes periféricos.

La estructura de co-cristal de 5C5 indica que el anticuerpo bloquea la interacción de HA de H5 con receptores del hospedador, impidiendo la unión vírica a la célula hospedadora y proporcionando una neutralización de la infección altamente eficaz, que supera a la de 1A2 (tabla 1, figura 7B). La conservación en el RBS entre los virus H5 permite una neutralización de amplio espectro por 5C5 (figura 8A). Los anticuerpos contra el RBS de HA de H1 también generan neutralización entre clados cruzados (Whittle y col., Proc Natl Acad Sci USA 108, 14216). La unión reducida de 5C5 a A/Egipto/N03072/2010 está posiblemente asociada con una eliminación en la posición 129, que es una característica compartida por los virus H5 del clado 2.2.1 (Cattoli y col., J Virol 85, 8718).

La transmisión sostenida de una persona a otra de H5 HPAI probablemente podría requerir cambios en el RBS para potenciar la unión de estructuras de ácido siálico-α2-6-galactosa; por ejemplo, Gln222Leu y Gly224Ser (226/228 en la numeración de H3). Sin embargo, si estos cambios alterasen el epítopo de 5C5 y eliminasen el reconocimiento por el Acn 5C5, podría perderse su interés para mitigar pandemias. De forma interesante, la reactividad del Acn 5C5 con una HA de Viet04 doble mutante que porta estos cambios del RBS no se vio afectada (tabla 4), lo que sugiere que el eventual virus pandémico debería seguir siendo susceptible a la neutralización por 5C5. El mecanismo de neutralización por 1A2 no está claro; parecen posibles la inhibición indirecta de la unión al receptor o la fusión a la membrana (figura 7). El epítopo de 1A2, ubicado más cerca de la membrana vírica en el dominio vestigial de esterasa está más altamente conservado entre HA de H5 que el epítopo de 5C5, que se cree que muta para esquivar las respuestas de anticuerpos neutralizantes (figura 8). La conservación del epítopo de 1A2 podría atribuirse a una inmunogenicidad reducida o, menos probablemente, a restricciones funcionales desconocidas que promueven la conservación (figura 5). La noción de que el dominio de esterasa vestigial comprende una superficie accesible que es menos inmunodominante que la punta altamente expuesta de HA1 se ve soportada por el descubrimiento de que parches superficiales estructuralmente equivalentes de subtipos víricos de H1 y H3 contemporáneos (2000-2011) también se encuentran altamente conservados (> 99 %), en comparación con los sitios de unión A (97 % y 93 %) o B (92 % y 93 %), en estos subtipos, respectivamente (figura 5B-D). En este sentido, los Acn que se unen a la región de esterasa vestigial de HA1 tienen el potencial de ser menos vulnerables a la deriva antigénica y median la protección homosubtípica contra clados divergentes.

Los presentes estudios indicaron una eficacia protectora de los epítopos de Ac neutralizantes se correlacionan positivamente con la distancia de la membrana vírica, mientras que la conservación se correlacionó inversamente; los Ac contra la punta expuesta de la HA proporcionan la protección más potente contra una estrecha variedad de virus.

El Ac 5C5 puede ser una excepción, al imitar al receptor del hospedador para acoplarse con el RBS conservado en la HA. En cambio, los Acn que se unen a epítopos proximales de membrana proporcionan una protección con reactividad cruzada amplia de mayor duración pero de potencia reducida. Por lo tanto, las estrategias terapéuticas que usan una combinación de Acn, tales como 5C5, 1A2 descritos en el presente documento y el Acn 7B8 contra el péptido de fusión aprovechan la diversidad espacial y mecanística entre estos tres epítopos neutralizantes (figura 5A), para reducir el riesgo de aparición de mutantes que escapen a la inmunidad en la población antes de que puedan producirse vacunas pandémicas eficaces.

Ejemplo 9: Bloqueo de carbohidratos de parches superficiales

Para probar la reactividad de Ac contra mutantes de CHO (véase la figura 1B), se evaluó la unión de 1A2 (se une al sitio E en el dominio de esterasa vestigial) y 5C5 (se une al sitio A/B en la cabeza globular) a proteínas HA1 mutantes que contienen N-carbohidratos individuales o múltiples adicionales (CHO), usando ForteBio.

Se produjeron proteínas HA1 individuales y multi-CHO en una cadena principal de VH HA1 de tipo silvestre (TS) marcada con His. Cinco días después de la infección, se purificó recHA a partir del sobrenadante de cultivo tisular usando perlas de Ni-NTA. La proteína eluida de las perlas se concentró a ~100-200 µl y se analizó mediante SDS-PAGE. Todos los mutantes de CHO se expresaron a niveles equivalentes y corrieron como una sola banda con un PM mayor que las especies de TS.

Para la determinación de la accesibilidad del Acm, se diluyeron todas las muestras a una conc. equivalente de 100 µg/ml usando tampón de unión de cinética ForteBio (PBS w. BSA). Todas las muestras se unieron a biosensores durante 1 h y después se sondaron con una solución que contenía IgG o 5C5 o 1A2 (10 µg/ml),

Se evaluó la unión de las siguientes variantes en el experimento (toda la numeración se basa en la proteína HA madura):

1. CHO6A	(Lys119Asn - NSS)
2. CHO6B	(Ser121Asn - NWS)
3. CHO7	(Glu126Asn - NAS)
4. CHO8B	(Gln192Asn, Pro194Ser - NNS)
5. CHO8D	(Pro194Asn - NTT)
6. CHO9	(Asn 240; Glu242Ser - NFS)
7. Vietnam TS (HA1)	
8. CHO2/7/8 HA1	(Asn140, Asn126, Asn 194)
9. CHO 2	(Lys140Asn - NSS)
10. Blanco	

CHO2, 7, 8D inhibieron a 5C5 pero no a 1A2 (figura 9). Los resultados de la unión y la disociación en tiempo real indicaron que solo CHO7 redujo significativamente la interacción de 5C5, aunque esta proteína se unió a 1A2 de manera equivalente a TS y el efecto solo fue auténticamente visible en la cinética de disociación, en la que fue evidente que el Ac no se unió con afinidad nm, pero se desprendió prácticamente por completo después de la fase de asociación. Este patrón fue distinto del observado en CHO278, por el cual el Ac 5C5 apenas se une, lo que implica que aunque CHO7 es responsable de la interferencia de una interacción robusta de IgG, la presencia de otros mutantes (CHO8 y CHO2) también proporciona obstrucción adicional a la unión del Ac (figura 9).

Variante de HA hiperglucosilada para centrar respuestas inmunitarias al epítopo de 1A2

Los datos en la figura 9 demuestran que un CHO HA1 que muestra el epítopo de 1A2 y que excluye otros epítopos dentro y alrededor de la cabeza globular altamente antigénica puede efectuarse usando la construcción CHO2, 7, 8D multi-CHO HA1, ya que esta muestra una alta reactividad contra 1A2 y nada de reactividad contra 5C5. La ausencia del tallo de HA en esta construcción impide la respuesta inmunitaria contra este componente.

Variante de HA hiperglucosilada para centrar respuestas inmunitarias al epítopo de 5C5

Para diseñar un CHO HA1 que mostrase específicamente el epítopo de 5C5, se necesitó excluir todos los demás epítopos alrededor del HA1, incluyendo la región del epítopo de 1A2. Se generó una serie de construcciones que incluyeron una posición de glucosilación adicional en Asn 72 (mutación de Pro en la posición 74 a Ser), que suprimió en este lugar la unión al Ac. Siguiendo los resultados de mutantes de CHO combinatorios explorados por su buena expresión, se identificó el mutante de CHO, CHO2, 4, 6, CAASP, para enmascarar todas las regiones que no reaccionan con 5C5 de la HA1. Esta construcción se expresó y usó en experimentos Fortebio para determinar las características de unión de esta construcción con respecto al reconocimiento de Ac. Los resultados mostraron que CHO2,4,6, CAASP inhibió la unión de 1A2, pero también redujo hasta cierto punto la reactividad de 5C5 en relación con el tipo silvestre (datos no mostrados). Estos datos proporcionan una prueba de principio de que pueden usarse los carbohidratos que enmascaran epítopos de HA para excluir respuestas inmunitarias contra cualquier región dada de la HA. La ausencia del tallo de HA en esta construcción impide la respuesta inmunitaria contra este componente.

Mutantes de HA hiperglucosilada para centrar respuestas inmunitarias al epítopo de 7B8

En el diseño de una variante de HA que muestra específicamente el epítopo de 7B8, se tiene que incluir la construcción de longitud completa, para que incorpore el epítopo de 7B8, en la región de tallo próxima a la membrana de HA. Dada la inhibición del Ac 5C5 demostrada por la HA1 de CHO2, 7, 8D multi-CHO (figura 1) y la inhibición de 1A2 por el mutante CAASP (figura 2), una construcción de longitud completa que comprenda CHO2, 7, 8D, CAASP enmascarará eficazmente la reactividad de los Ac contra la cabeza (es decir, similar a 5C5) y también contra el dominio vestigial de esterasa (es decir, similar a 1A2), dejando la región de unión de 7B8 en el tallo expuesta para la vigilancia inmunitaria.

Ejemplo 10: Análisis para la identificación de parches de superficie accesibles por anticuerpos conservados (CAASP) equivalentes en otros subtipos de HA

El concepto de la oclusión mediada por carbohidratos de los componentes más variables de la HA de H5 puede extenderse a subtipos distintos de H5. Con este fin, se analizó la conservación de restos de superficie entre virus de los siguientes;

1. subtipo H1 (global, circulante en seres humano de 2009-hasta la actualidad)
2. subtipo H7 (asiático, circulante entre especies aviares)
3. subtipo H7 (norteamericano/europeo, circulante entre especies aviares)
4. subtipo H9 (global, circulante entre especies aviares)

Estos análisis han identificado superficies invariantes (es decir, contra los que puede generarse una respuesta inmunitaria con protección cruzada), así como restos de superficie no conservados, que pueden enmascararse por la presencia de N-carbohidratos adicionales para impedir el reconocimiento inmunitario de estas áreas.

Procedimiento: Se descargó la secuencia del componente HA1 de virus de los subtipos humano H1pdm, H7 (aviar/humano) y H9 (aviar/humano) de la base de datos GISAID (el 11 de septiembre de 2012), se alinearon y se evaluó la divergencia de secuencia en cada una de las posiciones de aminoácidos. Se calculó el número de sustituciones de aminoácidos en cada posición dada usando como un porcentaje del total usando el programa. Se usó un valor de corte de > 99 % de conservación en cada posición para determinar el CAASP para cada subtipo. Estos restos se mapearon sobre la estructura de los respectivos subtipos de HA (H1, PDB ID 3M6S; H7, PDB ID 1TI8; PDB ID 1JSD) y se presentaron usando el programa Pymol.

El CAASP identificado entre los virus H1 (2009-2012) es grande, comprendiendo ~340 restos, con solo 47 restos definidos como no CAASP. Estos restos se lisan a continuación;

H1 CAASP (global, 2009-2012)

Todos los restos dentro del componente HA1 de la proteína madura, incluyendo los restos numerados:
1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 33, 34, 36, 37, 38, 39, 40 41, 42, 43, 44, 45, 46, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 85, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 117, 118, 120, 122, 123, 124, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 321, 323, 324, 325, 326, 327, 328 y 331

El CAASP identificado entre virus H7 y H9 circulantes entre especies aviares es más pequeño que el de los virus H1 humanos recientes. Dada la amplia diversidad geográfica entre las cepas del subtipo H7, los virus H7 se dividen en dos grupos a efectos de la identificación de CAASP; (1) virus aislados en Asia y (2) virus aislados en Europa y/o Norteamérica. Los restos identificados como el CAASP en cada grupo de virus se lista a continuación para cada grupo, respectivamente;

H7 CAASP (Asia)

Restos dentro del componente HA1 de la proteína madura numerados:
1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 23, 25, 26, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 39, 41, 42, 45, 46, 50, 51, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 76, 77, 79, 80, 81, 83, 85, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 94, 96, 98, 99, 100, 102, 103, 105, 106, 107, 108, 110, 111, 115, 116, 117, 122, 124, 126, 129, 131, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 142, 143, 144, 145, 149, 152, 153, 154, 156, 157, 158, 159, 161, 166, 167, 168, 169, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 178, 181, 182, 185, 186, 187, 189, 191, 192, 193, 194, 195, 197, 198, 200, 202, 203, 204, 206, 211, 212, 213, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 223, 224, 225, 228, 231, 232, 233, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 247, 250, 251, 253, 254, 255, 257, 258, 259, 260, 263, 265, 268, 270, 272, 273, 276, 277, 278,

279, 281, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 294, 296, 297, 299, 300, 302, 304, 305, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 325, 326, 327, 328 y 331.

H7 CAASP (Europa/Norteamérica)

Restos dentro del componente HA1 de la proteína madura numerados:
1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 16, 18, 19, 20, 21, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 41, 42, 45, 46, 50, 51, 52, 54, 55, 57, 58, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 69, 70, 71, 72, 76, 77, 79, 80, 82, 83, 85, 87, 88, 89, 90, 92, 94, 95, 96, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 105, 106, 107, 110, 111, 114, 115, 116, 117, 119, 121, 122, 123, 124, 127, 129, 131, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 149, 150, 153, 154, 155, 160, 162, 167, 168, 169, 170, 172, 173, 175, 176, 177, 179, 182, 183, 184, 186, 187, 188, 190, 192, 193, 196, 198, 199, 200, 201, 203, 204, 205, 207, 210, 212, 221, 222, 223, 224, 226, 229, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 248, 249, 251, 254, 256, 258, 260, 261, 266, 269, 271, 273, 275, 277, 278, 279, 280, 282, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 292, 295, 297, 298, 299, 300, 301, 303, 305, 306, 308, 309, 310, 311, 312, 314, 316, 317, 329 y 332.

H9 CAASP (global)

Restos dentro del componente HA1 de la proteína madura numerados:
1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 23, 25, 26, 27, 31, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 47, 49, 50, 51, 52, 54, 55, 58, 59, 60, 62, 63, 64, 65, 67, 71, 73, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 84, 85, 88, 90, 91, 92, 93, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 105, 106, 107, 110, 111, 117, 118, 119, 122, 123, 124, 128, 129, 130, 133, 134, 137, 138, 139, 141, 142, 143, 144, 145, 151, 152, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 166, 167, 168, 170, 171, 172, 175, 177, 181, 184, 185, 189, 190, 192, 196, 197, 201, 203, 204, 205, 208, 209, 210, 211, 215, 218, 219, 222, 223, 224, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 236, 237, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 247, 248, 250, 252, 254, 255, 256, 257, 259, 260, 263, 266, 268, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 277, 278, 279, 280, 282, 283, 284, 285, 287, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 296, 298, 299, 304, 305, 306, 307, 308, 310, 312, 313, 314, 315 y 320.

Basándose en los datos expuestos en los resultados experimentales anteriores, el enmascaramiento de HA1 de diversos subtipos de gripe con carbohidratos unidos a Asn adicionales para dirigir respuestas inmunitarias contra epítopos altamente conservados (regiones CAASP) puede lograrse del siguiente modo;

Para dirigir la respuesta inmunitaria a las regiones CAASP de la HA de virus H1 circulantes globalmente entre la población humana de 2009 hasta la actualidad, se pudo incluir glucosilación adicional unida a Asn en las posiciones 19, 22, 31, 32, 35, 47, 56, 83, 84, 86, 97, 116, 119, 121, 125, 134, 138, 141, 143, 155, 156, 162, 163, 183, 185, 186, 197, 203, 205, 215, 216, 235, 260, 272, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320 o 322 del componente HA1 de la proteína madura.

Para dirigir la respuesta inmunitaria a las regiones CAASP de la HA de virus H7 circulantes entre especies aviares en Europa y/o Norteamérica, se pudo introducir glucosilación unida a Asn adicional en las posiciones 11, 14, 17, 22, 24, 27, 28, 60, 61, 35, 36, 37, 38, 40, 43, 44, 47, 48, 49, 52, 68, 75, 78, 82, 84, 86, 93, 95, 97, 101, 104, 109, 112, 113, 114, 118, 119, 120, 121, 123, 125, 127, 128, 130, 132, 133, 134, 141, 146, 147, 148, 150, 151, 155, 160, 162, 163, 164, 165, 170, 179, 180, 183, 184, 188, 190, 196, 199, 201, 205, 207, 208, 209, 210, 214, 222, 226, 227, 229, 230, 234, 246, 248, 249, 252, 256, 261, 262, 264, 266, 267, 269, 271, 274, 275, 280, 282, 292, 293, 295, 298, 301, 303, 306, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 329 o 330 del componente HA1 de la proteína madura.

Para dirigir la respuesta inmunitaria a las regiones CAASP de la HA de virus H7 circulantes entre especies aviares en Asia, se pudo introducir glucosilación unida a Asn adicional en las posiciones 11, 14, 22, 24, 27, 28, 35, 36, 37, 38, 40, 43, 44, 47, 48, 49, 52, 60, 61, 68, 75, 78, 82, 84, 86, 93, 95, 97, 101, 104, 109, 112, 113, 114, 118, 119, 120, 121, 123, 125, 127, 128, 130, 132, 133, 134, 141, 146, 147, 148, 150, 151, 155, 160, 162, 163, 164, 165, 170, 177, 179, 180, 183, 184, 188, 190, 196, 199, 201, 205, 207, 208, 209, 210, 214, 222, 226, 227, 229, 230, 234, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 256, 261, 262, 264, 266, 267, 269, 271, 274, 275, 280, 282, 292, 293, 295, 298, 301, 303, 306, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 329 o 330 del componente HA1 de la proteína madura.

Para dirigir la respuesta inmunitaria a las regiones CAASP de la HA de virus H9 circulantes globalmente entre especies aviares, se pudo introducir glucosilación unida a Asn adicional en las posiciones 7, 20, 22, 2428, 29, 30, 34, 45, 46, 48, 53, 56, 57, 61, 66, 68, 69, 70, 72, 74, 75, 83, 86, 87, 89, 94, 95, 103, 104, 108, 109, 112, 113, 114, 115, 116, 120, 121, 125, 126, 127, 131, 132, 135, 136, 140, 146, 147, 148, 149, 150, 153, 161, 162, 163, 164, 165, 169, 173, 174, 176, 178, 179, 180, 182, 183, 186, 187, 188, 191, 193, 194, 195, 198, 199, 200, 202, 206, 207, 212, 213, 214, 216, 217, 220, 221, 225, 226, 235, 238, 246, 249, 251, 253, 258, 261, 262, 264, 265, 267, 269, 276, 281, 286, 288, 295, 297, 300, 301, 302, 303, 309, 311, 316, 317, 318, 319, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330 o 331 del componente HA1 de la proteína madura.

Listado de secuencias

SEQ ID NO: 1: Secuencia de aminoácidos de hemaglutinina de H5 madura del virus A/Vietnam/1203/04 (adaptada de NCBI AY818135)

```
1         10        20        30        40        50        60
DQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTHAQDILEKKHNGKLCDLDGVKPLILRDCSVAGW

61        70        80        90        100       110       120
LLGNPMCDEFINVPEWSYIVEKANPVNDLCYPGDFNDYEELKHLLSRINHFEKIQIIPKS

121       130       140       150       160       170       180
SWSSHEASLGVSSACPYQGKSSFFRNVVWLIKKNSTYPTIKRSYNNTNQEDLLVLWGIHH

181       190       200       210       220       230       240
PNDAAEQTKLYQNPTTYISVGTSTLNQRLVPRIATRSKVNGQSGRMEFFWTILKPNDAIN

241       250       260       270       280       290       300
FESNGNFIAPEYAYKIVKKGDSTIMKSELEYGNCNTKCQTPMGAINSSMPFHNIHPLTIG

301       310       320       330       340       350       360
ECPKYVKSNRLVLATGLRNSPQRERRRKKRGLFGAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQ

361       370       380       390       400       410       420
GSGYAADKESTQKAIDGVTNKVNSIIDKMNTQFEAVGREFNNLERRIENLNKKMEDGFLD

421       430       440       450       460       470       480
VWTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNAKELGNGCFEFYHKCDNECME

481       490       500       510       520       530       540
SVRNGTYDYPQYSEEARLKREEISGVKLESIGIYQILSIYSTVASSLALAIMVAGLSLWM

541       550
CSNGSLQCRICI
```

SEQ ID NO: 2: Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de IgG 1A2 de ratón

```
1         10        20        30        40        50        60
                                CDRH1                       CDRH2
EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSFIMYWVKQKPGQGLEWLGYIDPYNDGTKY
61        70        80        90        100       110       120
                                                CDRH3
NEKFEGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCAKRGNYGNGFAYWGQGTLVTVSAAKTS
```

SEQ ID NO: 3: Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de IgG 1A2 de ratón

```
1         10        20        30        40        50        60
                                CDRL1                       CDRL2
DIVMTQSQKFVSTSVGDRVSVTCKASQNVGSNVAWYQHKPGHSPTALIYSASHRYSGVPD
61        70        80        90        100       110
                                        CDRL3
RFTGSESGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCQQYYSYPYTFGGGTKLEIKRADAAPT
```

SEQ ID NO: 4: Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de IgG 7B8 de ratón

```
1         10        20        30        40        50        60
                                CDRH1                       CDRH2
QVQLQQSGAELVRPGTSVKISCKAS**GYAFSNYWLG**WVKQRPGHGLEWIG**DIYPGSGNNHY**
61        70        80        90        100       110       120
                                          CDRH3
**NEKFKG**KATLTADKSSRTVYMQLSSLTSEDSSVYFCTR**GPIFTTAWFAY**WGQGTLVTVSAAQKQTW
```

SEQ ID NO: 5: Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de IgG 7B8 de ratón

```
1         10        20        30        40        50        60
                                CDRL1                       CDRL2
DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC**KASQNVDTYVA**WYQQKPGQSPKALIY**SASYRYS**GVPD
61        70        80        90        100       110
                                CDRL3
RFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFC**QQYKTYPFT**FGSGTKLEIKRADAAPT
```

SEQ ID NO: 6: Secuencia de CDR1 de la cadena pesada del Ac 1A2 GYTFTSFIMY

SEQ ID NO: 7: Secuencia de CDR2 de la cadena pesada del Ac 1A2 DPYNDGTKYNEKFEG

SEQ ID NO: 8: Secuencia de CDR3 de la cadena pesada del Ac 1A2 RGNYGNGFAY

SEQ ID NO: 9: Secuencia de CDR1 de la cadena ligera del Ac 1A2 KASQNVGSNVA

SEQ ID NO: 10: Secuencia de CDR2 de la cadena ligera del Ac 1A2 SASHRYS

SEQ ID NO: 11: Secuencia de CDR3 de la cadena ligera del Ac 1A2 QQYYSYPYT

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Centers for Disease Control and Prevention

<120> NUEVOS ANTÍGENOS DE GRIPE Y ANTICUERPOS

<130> VB65547

<160> 11

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 552
<212> PRT
<213> Virus de la gripe A/Vietnam/1203/04

<400> 1

Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val
1 5 10 15

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile
20 25 30

Leu Glu Lys Lys His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys
35 40 45

Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn
50 55 60

Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val
65 70 75 80

Glu Lys Ala Asn Pro Val Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Asn
85 90 95

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu
100 105 110

Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Ser His Glu Ala Ser
115 120 125

Leu Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Gln Gly Lys Ser Ser Phe Phe
130 135 140

Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Ser Thr Tyr Pro Thr Ile
145 150 155 160

Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp
165 170 175

Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Lys Leu Tyr Gln
180 185 190

Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg
195 200 205

Leu Val Pro Arg Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly
210 215 220

Arg Met Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn
225 230 235 240

Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile
245 250 255

Val Lys Lys Gly Asp Ser Thr Ile Met Lys Ser Glu Leu Glu Tyr Gly
260 265 270

Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Met Gly Ala Ile Asn Ser Ser
275 280 285

Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys
290 295 300

Tyr Val Lys Ser Asn Arg Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser
305 310 315 320

Pro Gln Arg Glu Arg Arg Arg Lys Lys Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile
325 330 335

Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr
340 345 350

Gly Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys
355 360 365

Glu Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser
370 375 380

Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe
385 390 395 400

Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp
405 410 415

Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met
420 425 430

Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu
435 440 445

Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly
450 455 460

Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu
465 470 475 480

Ser Val Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala
485 490 495

Arg Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly
500 505 510

Ile Tyr Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala
515 520 525

Leu Ala Ile Met Val Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly
530 535 540

Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile
545 550

<210> 2
<211> 123
<212> PRT
<213> Murina

<400> 2

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Phe
20 25 30

Ile Met Tyr Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Glu Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Arg Gly Asn Tyr Gly Asn Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Ser
115 120

<210> 3
<211> 114
<212> PRT
<213> Murina

<400> 3

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Val Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Ser Asn
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly His Ser Pro Thr Ala Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser His Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Glu Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala
100 105 110

Pro Thr

<210> 4
<211> 126
<212> PRT
<213> Murina

<400> 4

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Trp Leu Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Asn His Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Arg Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ser Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Thr Arg Gly Pro Ile Phe Thr Thr Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Gln Lys Gln Thr Trp
115 120 125

<210> 5
<211> 114
<212> PRT
<213> Murina

<400> 5

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Asp Thr Tyr
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Lys Thr Tyr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala
100 105 110

Pro Thr

<210> 6

<211> 10
<212> PRT
<213> Murina

<400> 6

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Phe Ile Met Tyr
1 5 10

<210> 7
<211> 15
<212> PRT
<213> Murina

<400> 7

Asp Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Glu Gly
1 5 10 15

<210> 8
<211> 10
<212> PRT
<213> Murina

<400> 8

Arg Gly Asn Tyr Gly Asn Gly Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 9
<211> 11
<212> PRT
<213> Murina

<400> 9

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Ser Asn Val Ala
1 5 10

<210> 10
<211> 7
<212> PRT
<213> Murina

<400> 10

Ser Ala Ser His Arg Tyr Ser
1 5

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> Murina

<400> 11

Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5

REIVINDICACIONES

1. Un antígeno de hemaglutinina de la gripe modificado que comprende glucosilación unida a Asn adicional en al menos dos parches superficiales seleccionados entre el grupo de parches superficiales que consisten en: Sitio A, Sitio B, Sitio C, Sitio D y Sitio E, en el que dicho antígeno de hemaglutinina modificado es un antígeno de hemaglutinina aislado de la naturaleza, que tiene glucosilación unida a Asn adicional en comparación con la glucosilación unida a Asn presente en la hemaglutinina de las principales cepas de origen natural del mismo subtipo.

2. El antígeno de hemaglutinina de la gripe modificado de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende glucosilación adicional unida a Asn unida a:

i) uno o más restos de aminoácido del Sitio A, y
ii) uno o más restos de aminoácido del Sitio B.

3. El antígeno de la reivindicación 2, que además comprende glucosilación adicional unida a Asn unida a uno o más restos de aminoácido del Sitio D.

4. El antígeno de hemaglutinina de la gripe modificado de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende glucosilación adicional unida a Asn unida a:

i) uno o más restos de aminoácido del Sitio C,
ii) uno o más restos de aminoácido del Sitio D, y
iii) uno o más restos de aminoácido del Sitio E.

5. El antígeno de la reivindicación 4, que además comprende glucosilación adicional unida a Asn unida a uno o más restos de aminoácido del Sitio A.

6. El antígeno de hemaglutinina de la gripe modificado de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende glucosilación adicional unida a Asn unida a:

i) uno o más restos de aminoácido del Sitio A,
ii) uno o más restos de aminoácido del Sitio B, y
iii) uno o más restos de aminoácido del Sitio E.

7. El antígeno de la reivindicación 6, que comprende además glucosilación adicional unida a Asn unida a:

i) uno o más restos de aminoácido del Sitio C, y
ii) uno o más restos de aminoácido del Sitio D.

8. El antígeno de cualquiera de las reivindicaciones anteriores:

(i) que además comprende glucosilación adicional unida a Asn unida a uno o más restos de aminoácido del Sitio A, Sitio B, Sitio C, Sitio D o Sitio E o cualquier combinación de los mismos y/o
(ii) en el que se ha efectuado una sustitución de Lys a Asn en la posición 140 de la SEQ ID NO: 1 o en el que se ha modificado una variante de la SEQ ID NO: 1 para introducir un sitio aceptor para glucosilación unida a Asn en la posición 140 o una posición correspondiente a 140 y/o
(iii) en el que se ha efectuado una sustitución de Glu a Asn en la posición 126 de la SEQ ID NO: 1 o en el que se ha modificado una variante de la SEQ ID NO: 1 para introducir un sitio aceptor para glucosilación unida a Asn en la posición 126 o una posición correspondiente a 126 y/o
(iv) en el que se ha efectuado una sustitución de Lys a Asn en la posición 119 de la SEQ ID NO: 1 o en el que se ha modificado una variante de la SEQ ID NO: 1 para introducir un sitio aceptor para glucosilación unida a Asn en la posición 119 o una posición correspondiente a 119 y/o
(v) en el que se ha efectuado una sustitución de Ser a Asn en la posición 121 de la SEQ ID NO: 1 o en el que se ha modificado una variante de la SEQ ID NO: 1 para introducir un sitio aceptor para glucosilación unida a Asn en la posición 121 o una posición correspondiente a 121 y/o
(vi) en el que se ha efectuado una sustitución de Gln a Asn en la posición 192 de la SEQ ID NO: 1 y se ha efectuado una sustitución de Pro a Thr o de Pro a Ser en la posición 194 de la SEQ ID NO: 1 o se han sustituido restos correspondientes en una variante de la SEQ ID NO: 1 para introducir un sitio aceptor para glucosilación unida a Asn en la posición 192 y/o
(vii) en el que se ha efectuado una sustitución de Pro a Asn en la posición 194 de la SEQ ID NO: 1 o en el que se ha modificado una variante de la SEQ ID NO: 1 para introducir un sitio aceptor para glucosilación unida a Asn en la posición 194 o una posición correspondiente a 194 y/o
(viii) en el que se ha efectuado una sustitución de Lys a Asn en la posición 307 de la SEQ ID NO: 1 y se ha efectuado una sustitución de Asn a Thr o de Asn a Ser en la posición 309 de la SEQ ID NO: 1 o se han sustituido restos correspondientes en una variante de la SEQ ID NO: 1 para introducir un sitio aceptor para glucosilación unida a Asn en la posición 307 y/o
(ix) en el que se ha efectuado una sustitución de Glu a Ser o de Glu a Thr en la posición 242 de la SEQ ID NO: 1 o en el que se ha modificado una variante de la SEQ ID NO: 1 para introducir un sitio aceptor para glucosilación

unida a Asn en la posición 240 o una posición correspondiente a 240 y/o
(x) en el que se ha efectuado una sustitución de Pro a Ser o de Pro a Thr en la posición 74 de la SEQ ID NO: 1 o en el que se ha modificado una variante de la SEQ ID NO: 1 para introducir un sitio aceptor para glucosilación unida a Asn en la posición 72 o una posición correspondiente a 72 y/o
(xi) en el que la hemaglutinina es de una cepa H1, H2, H3, H5, H7 o H9 y/o
(xii) en el que la hemaglutinina es de una cepa H5 y/o
(xiii) en el que la hemaglutinina carece del tallo de HA o de parte del tallo.

9. Un polinucleótido que codifica un antígeno de hemaglutinina modificado como se describe en cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

10. Una composición inmunogénica que comprende un antígeno como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

11. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 10,

(i) que además comprende un adyuvante y/o
(ii) en la que la composición es multivalente.

12. La composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11 para su uso en medicina.

13. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 12 para su uso en la prevención de la gripe.

14. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 13 para su uso en la prevención de la gripe causada por un clado diferente al clado al que pertenece el antígeno modificado.

15. Un procedimiento de producción de un antígeno como se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende expresar un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 9 en una célula eucariota, tal como una célula de mamífero, por ejemplo, una célula CHO o una célula de insecto.

16. El antígeno o la composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en un procedimiento de prevención y/o tratamiento contra la enfermedad gripal, comprendiendo dicho procedimiento la administración de dicho antígeno o composición inmunogénica a una persona que lo necesite.

17. El antígeno o la composición inmunogénica para su uso de acuerdo con la reivindicación 16, en el que se administran menos de 15 microgramos, tal como entre 3,75 y 10 microgramos de hemaglutinina por dosis.

Figura 1A

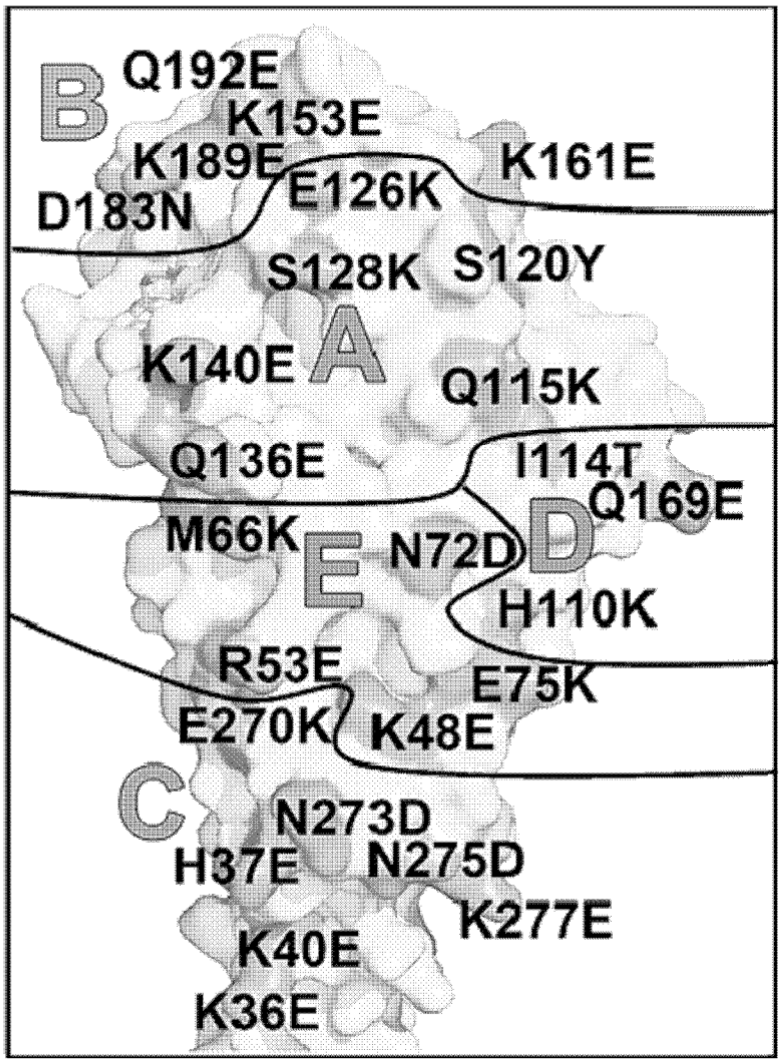

B
Q192E
K153E
K189E
K161E
D183N
E126K
S128K
S120Y
A
K140E
Q115K
Q136E
I114T
Q169E
M66K
N72D
D
E
H110K
R53E
E75K
E270K
K48E
C
N273D
H37E
N275D
K277E
K40E
K36E

Figura 1B

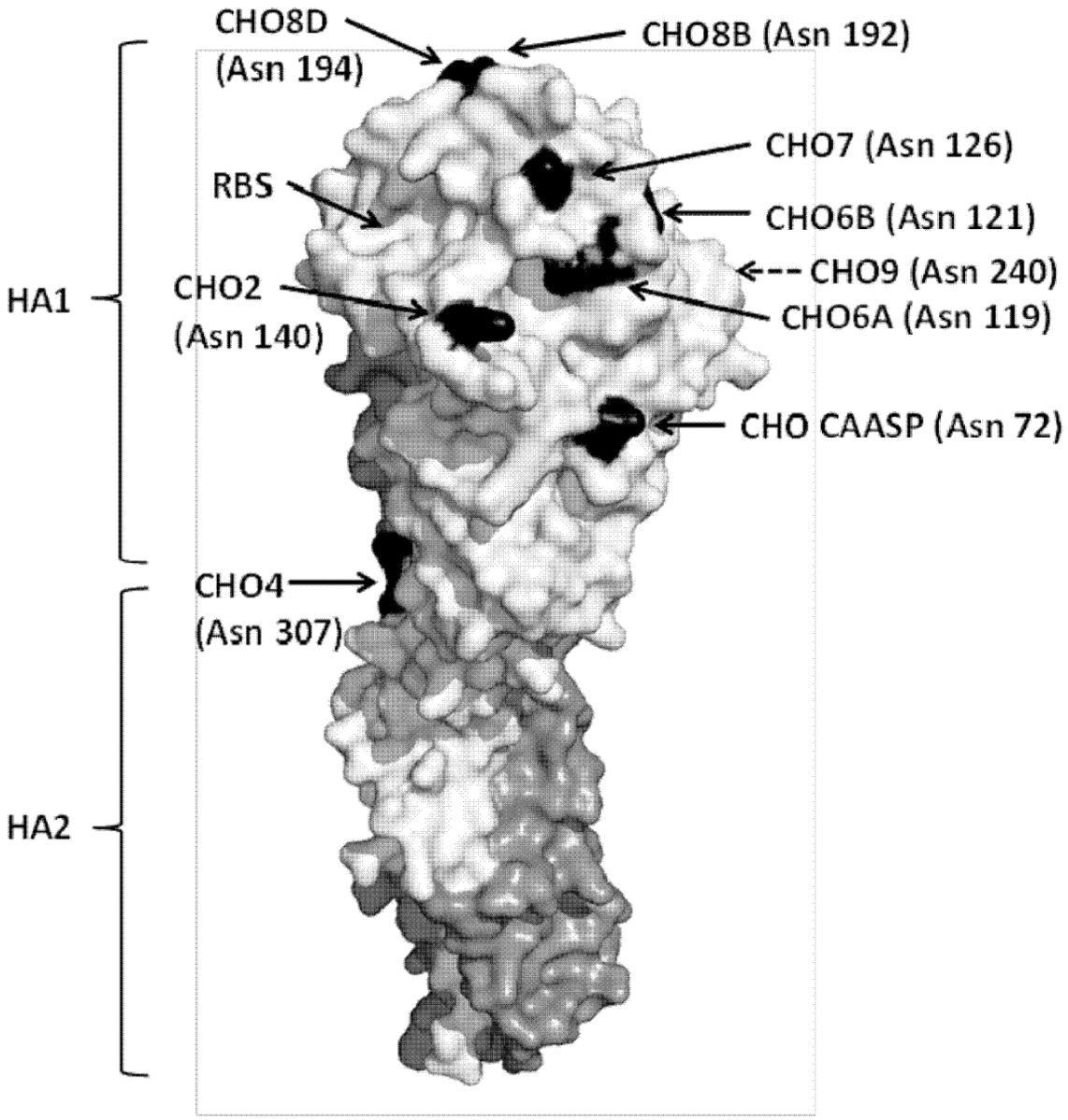

CHO8D
(Asn 194)
CHO8B (Asn 192)
CHO7 (Asn 126)
RBS
CHO6B (Asn 121)
CHO9 (Asn 240)
HA1
CHO2
(Asn 140)
CHO6A (Asn 119)
CHO CAASP (Asn 72)
CHO4
(Asn 307)
HA2

Figura 2

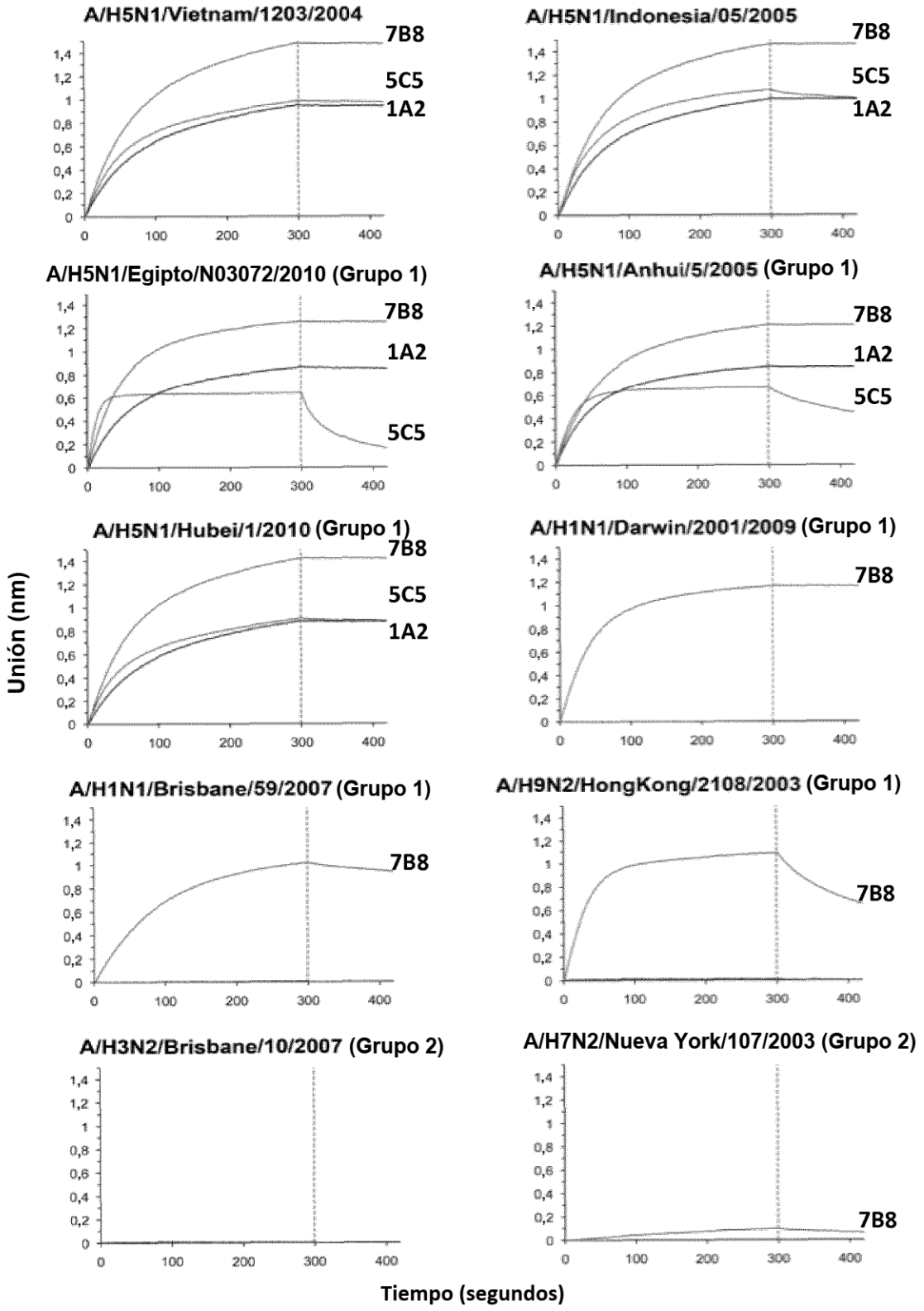

A/H5N1/Vietnam/1203/2004
7B8
5C5
1A2
A/H5N1/Indonesia/05/2005
7B8
5C5
1A2
A/H5N1/Egipto/N03072/2010 (Grupo 1)
7B8
1A2
5C5
A/H5N1/Anhui/5/2005 (Grupo 1)
7B8
1A2
5C5
A/H5N1/Hubei/1/2010 (Grupo 1)
7B8
5C5
1A2
A/H1N1/Darwin/2001/2009 (Grupo 1)
7B8
A/H1N1/Brisbane/59/2007 (Grupo 1)
7B8
A/H9N2/HongKong/2108/2003 (Grupo 1)
7B8
A/H3N2/Brisbane/10/2007 (Grupo 2)
A/H7N2/Nueva York/107/2003 (Grupo 2)
7B8
Unión (nm)
Tiempo (segundos)

Figura 3

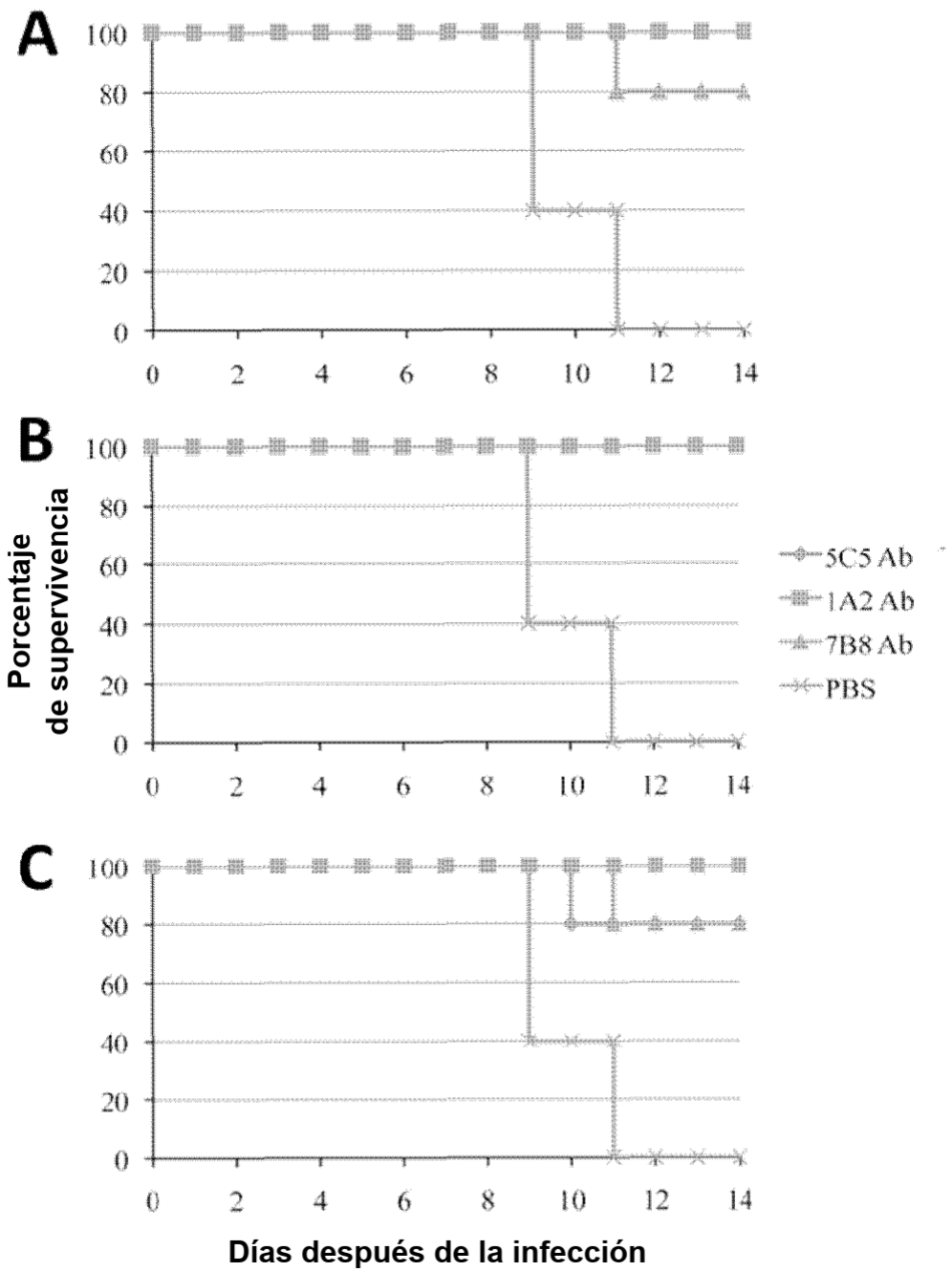

A
B
C
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
14
Porcentaje de supervivencia
5C5 Ab
1A2 Ab
7B8 Ab
PBS
Días después de la infección

Figura 4

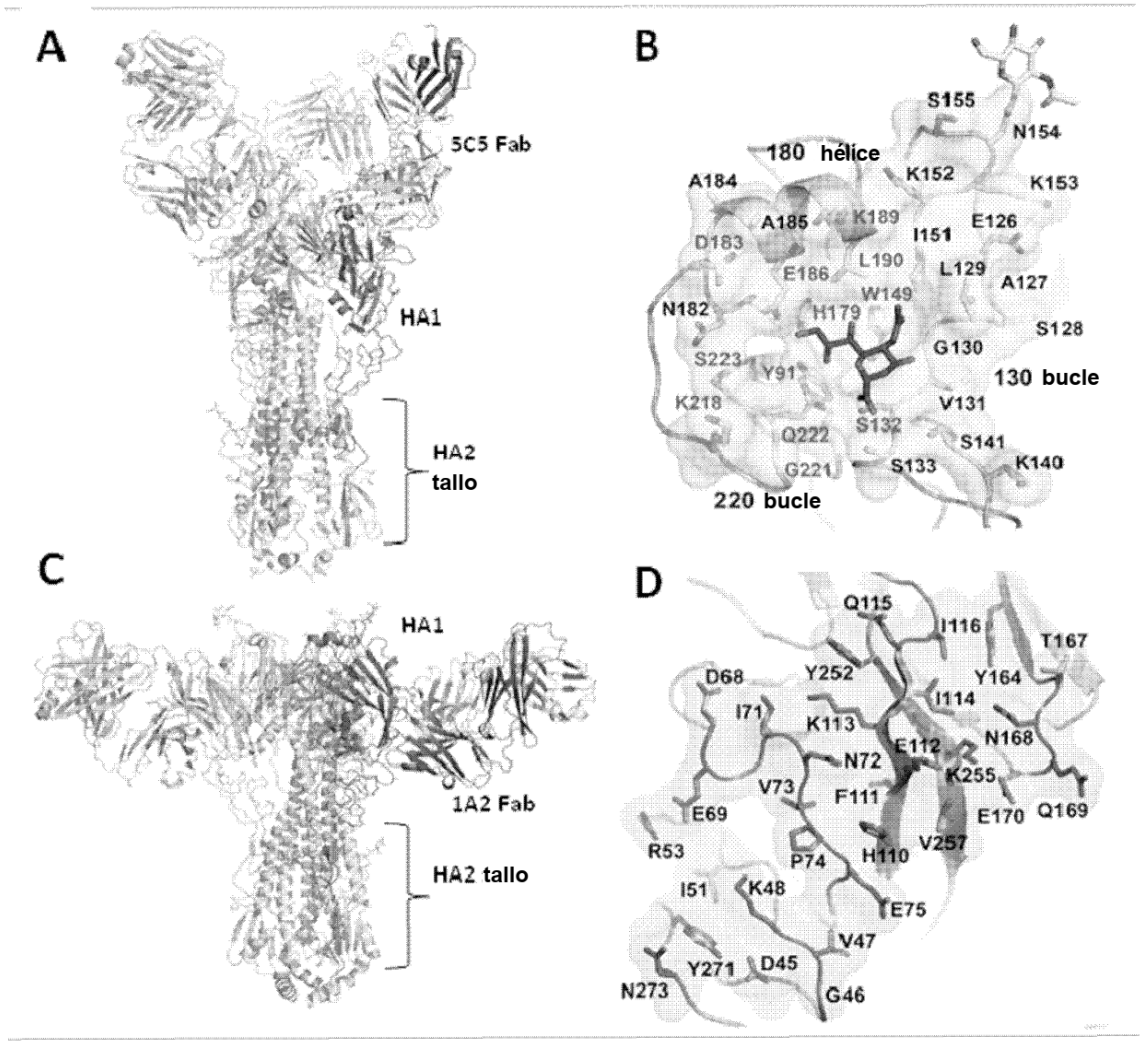

A
5C5 Fab
HA1
HA2
tallo
B
S155
N154
180 hélice
K152
K153
A184
A185
K189
E126
D183
I151
L190
E186
L129
A127
W149
N182
H179
S128
G130
S223
Y91
130 bucle
K218
V131
S132
Q222
S141
G221
S133
K140
220 bucle
C
HA1
1A2 Fab
HA2 tallo
D
Q115
I116
T167
D68
Y252
Y164
I114
I71
K113
E112
N168
N72
K255
V73
F111
E69
E170
Q169
R53
P74
H110
V257
I51
K48
E75
V47
Y271
D45
N273
G46

Figura 5

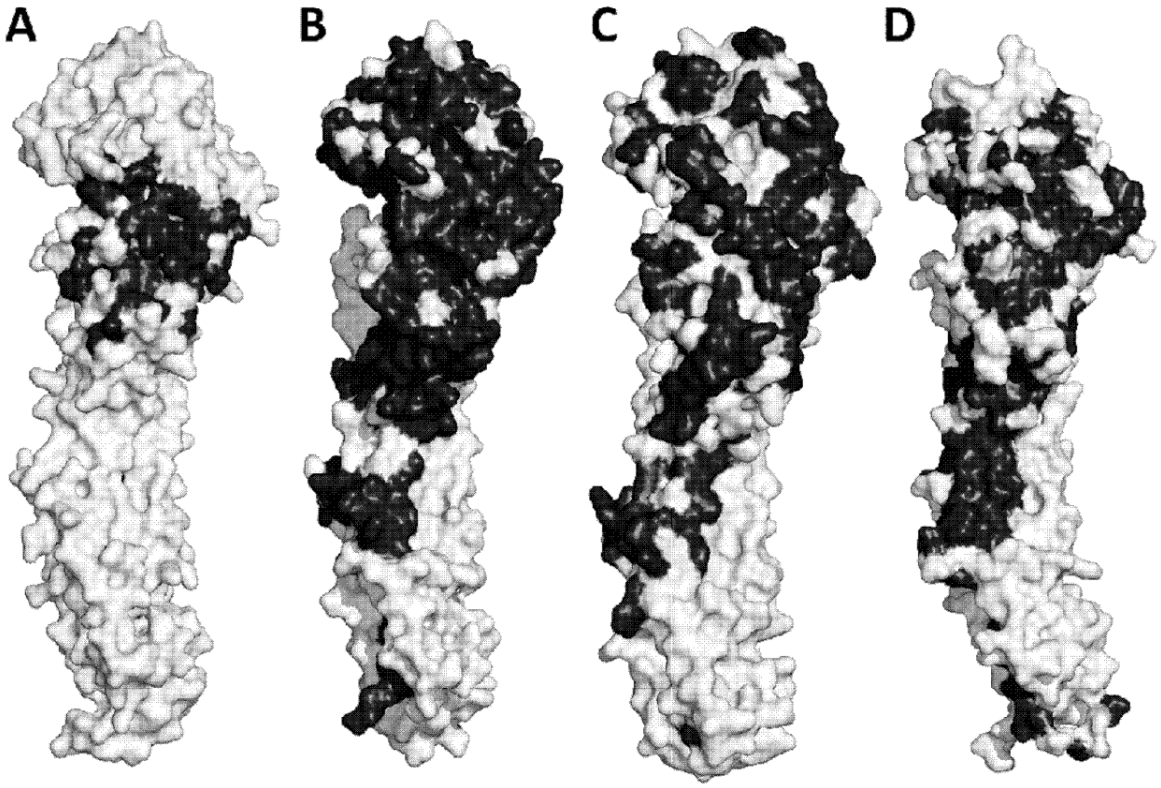


Figura 6

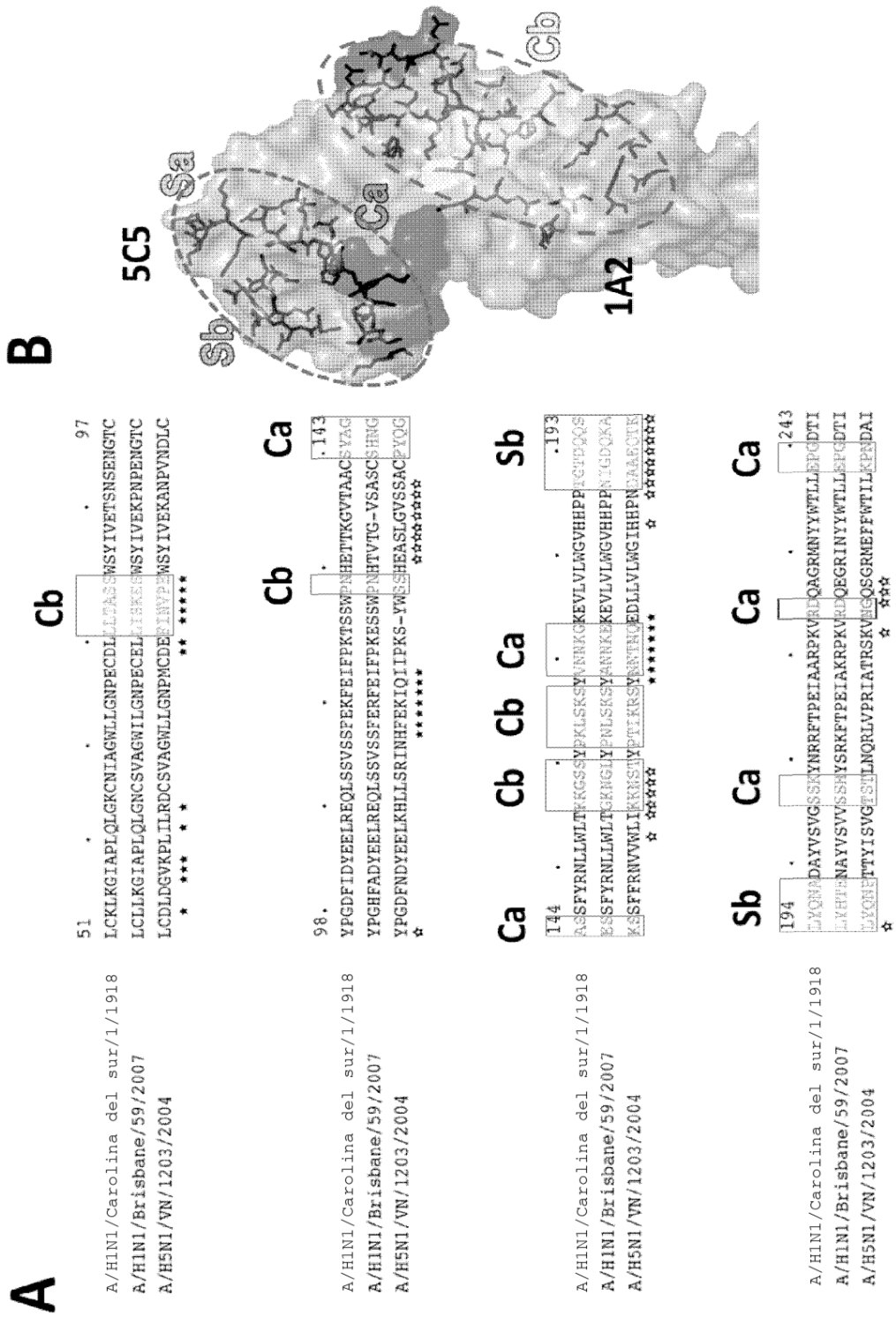

A
B
5C5
1A2
Sa
Sb
Ca
Cb
A/H1N1/Carolina del sur/1/1918
A/H1N1/Brisbane/59/2007
A/H5N1/VN/1203/2004

Figura 7a

Inhibición de la hemaglutinación

Anticuerpo	Virus				
	VN/1203	Anhui/05	Indo/05	Faisán/NJ	Brisbane/59
1A2 IgG	-	16	-	-	-
1A2 Fab2'	-	-	-	-	-
1A2 Fab	-	-	-	-	-
5C5 IgG	128	64	64	64	-
5C5 Fab2'	64	32	64	32	-
5C5 Fab	128	-	-	-	-

Figura 7b

Microneutralización

Anticuerpo	Virus				
	VN/1203	Anhui/05	Indo/05	Faisán/NJ	Brisbane/59
1A2 IgG	128	512	1024	512	<16
1A2 Fab2'	64	256	1024	512	<16
1A2 Fab	<16	<16	<16	<16	<16
5C5 IgG	16,400	256	36,800	36,800	<16
5C5 Fab2'	8,200	256	2,048	36,800	<16
5C5 Fab	512	<16	32	512	<16

Figura 7c

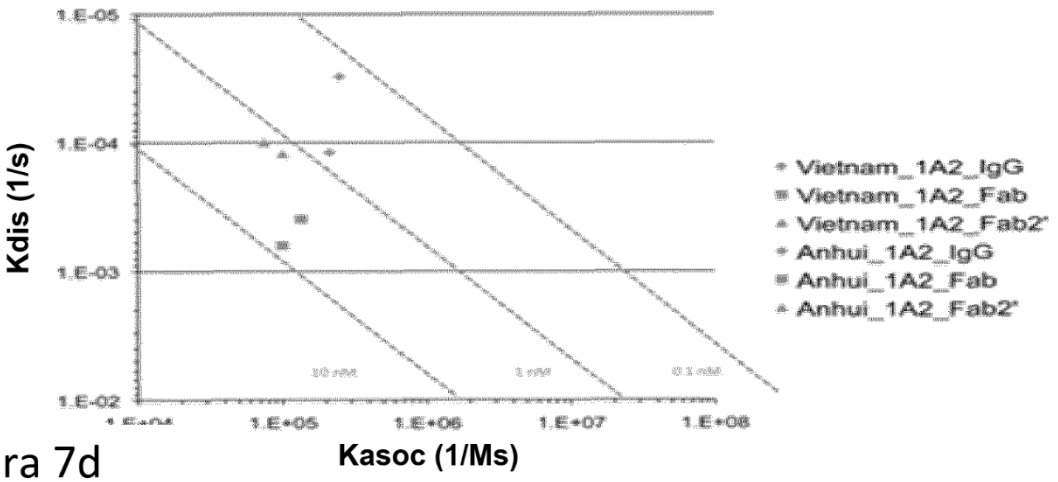


Figura 7d

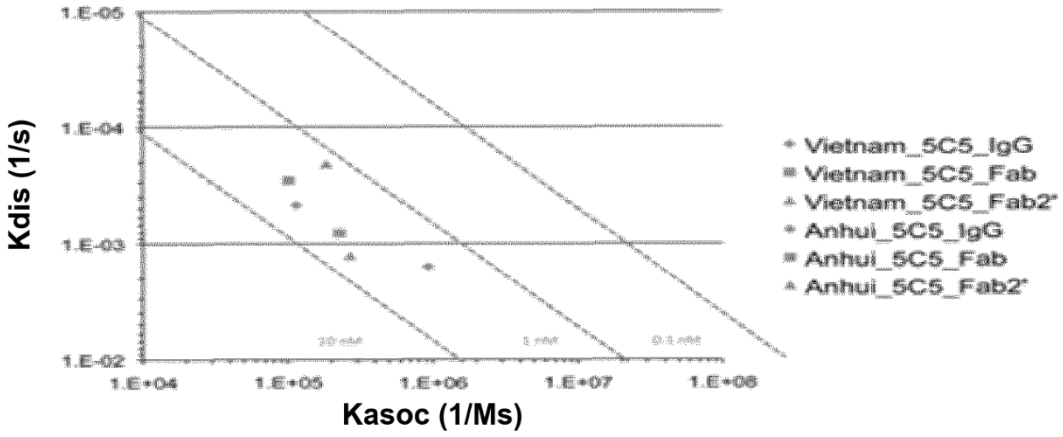


Figura 7e

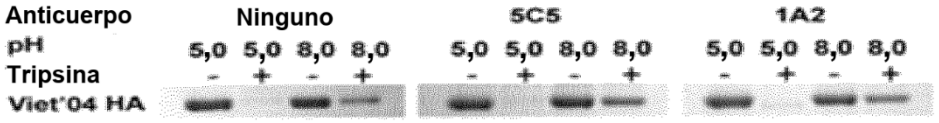


Figura 8

A

Epítopo 5C5

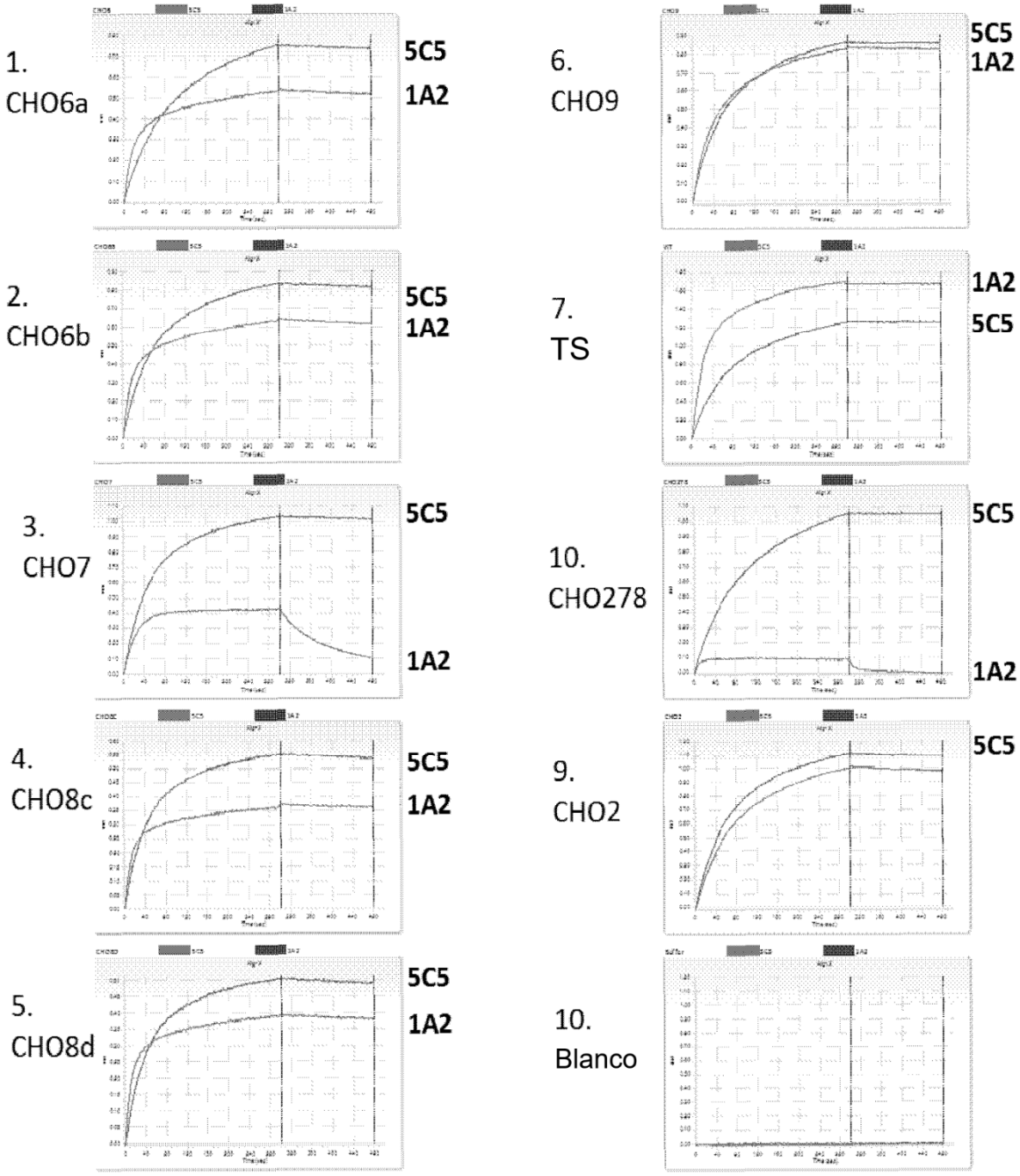
Cepa vírica	Clado	Posición de aminoácido																												
		91	126	127	128	129	130	131	132	133	140	141	149	151	152	153	154	155	179	182	183	184	185	186	189	190	218	221	222	223
A/H5N1/Vietnam/1203/2004	1	Y	E	A	S	L	G	V	S	S	K	S	W	I	K	K	N	S	H	N	D	A	A	E	K	L	K	G	Q	S
A/H5N1/Indonesia/05/2005	2.1	-	-	-	-	S	-	-	-	-	S	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-
A/H5N1/Hubei/1/2010	2.3.2	-	-	-	-	S	-	-	-	A	R	-	-	-	-	-	D	N	-	-	-	E	-	-	R	-	-	-	-	-
A/H5N1/Anhui/05/2005	2.3.4	-	-	-	-	S	-	-	-	-	T	P	-	-	-	-	-	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A/H5N1/Egipto/N03072/2010	2.2.1	-	-	-	-	.	-	-	-	-	R	-	-	T	-	-	D	N	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-
A/H5N2/Faisán/NJ/1335/98	N.A.	-	D	-	-	S	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mutagenesis			K		K						E					E					N				E				L	

B

Epítopo 1A2

Cepa vírica	Clado	Posición de aminoácido																												
		45	46	47	48	51	53	68	69	71	72	73	74	75	110	111	112	113	114	115	116	164	167	168	169	170	252	255	257	271	273
A/H5N1/Vietnam/1203/2004	1	D	G	V	K	I	R	D	E	I	N	V	P	E	H	F	E	K	I	Q	I	Y	T	N	Q	E	Y	K	V	Y	N
A/H5N1/Indonesia/05/2005	2.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A/H5N1/Hubei/1/2010	2.3.2	N	-	-	-	-	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A/H5N1/Anhui/05/2005	2.3.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A/H5N1/Egipto/N03072/2010	2.2.1	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	-	-	-
A/H5N2/Faisán/NJ/1335/98	N.A.	S	-	-	R	-	K	-	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-
Mutagenesis					E		E				D			K	K				T	K					E						D

Figura 9


1.
CHO6a
5C5
1A2
2.
CHO6b
5C5
1A2
3.
CHO7
5C5
1A2
4.
CHO8c
5C5
1A2
5.
CHO8d
5C5
1A2
6.
CHO9
5C5
1A2
7.
TS
1A2
5C5
10.
CHO278
5C5
1A2
9.
CHO2
5C5
10.
Blanco