

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 784 189**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/12** (2006.01)

**A61K 39/145** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.03.2010 PCT/US2010/028968**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.09.2010 WO10111687**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2010 E 10756977 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2020 EP 2411049**

54 Título: **Métodos y composiciones para la inmunización contra virus**

30 Prioridad:

**27.03.2009 US 164385 P**

**28.03.2009 US 164387 P**

**28.03.2009 US 164388 P**

**28.03.2009 US 164389 P**

**12.03.2010 US 313676 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.09.2020**

73 Titular/es:

**ACADEMIA SINICA (100.0%)  
128, Academia Road, Section 2, Nankang  
Taipei 11529, TW**

72 Inventor/es:

**WONG, CHI-HUEY;  
MA, CHE;  
WANG, CHENG-CHI y  
CHEN, JUINE-RUEY**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 784 189 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

Métodos y composiciones para la inmunización contra virus

## CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

5 La invención se refiere, en general, a polipéptidos virales parcialmente glicosilados que son útiles para generar composiciones inmunogénicas potentes, ampliamente reactivas y eficaces contra el virus. En particular, la invención se refiere a vacunas generadas utilizando el péptido de hemaglutinina (HA) del virus de la gripe monoglicosilado, exhibiendo las vacunas una potente actividad contra los virus de la gripe. La invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden las glicoproteínas y vacunas generadas a partir de ellas, y a métodos para utilizar los polipéptidos de HA desglicosilados para la profilaxis y el tratamiento de infecciones por virus de la gripe.

## 10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En eucariotas, residuos de azúcar están comúnmente enlazados a cuatro residuos de aminoácidos diferentes. Estos residuos de aminoácidos se clasifican como enlazados por O (serina, treonina e hidroxilisina) y enlazados por N (asparagina). Los azúcares enlazados a O se sintetizan en el aparato de Golgi o en el retículo endoplasmático (ER) rugoso a partir de azúcares de nucleótidos. Los azúcares enlazados a N se sintetizan a partir de un precursor común, y posteriormente se procesan. Es conocido que la adición de cadenas de hidratos de carbono enlazadas a N es importante para la estabilización del plegamiento, la prevención de la degradación en el retículo endoplasmático, la oligomerización, la actividad biológica y el transporte de glicoproteínas. La adición de oligosacáridos enlazados a N a residuos de Asn específicos juegan un papel importante en la regulación de la actividad, estabilidad o antigenicidad de proteínas maduras de los virus (Opdenakker G. y col. *FASEB Journal* 7, 1330-1337 1993). También se ha sugerido que se requiere una glicosilación enlazada a N para el plegamiento, el transporte, la expresión en la superficie celular, la secreción de glicoproteínas (Helenius, A., *Molecular Biology of the Cell* 5, 253-265 1994), protección contra la degradación proteolítica y mejora de la solubilidad de las glicoproteínas (Doms *et al.*, *Virology* 193, 545-562 1993). Las glicoproteínas de la superficie viral no solo son necesarias para el correcto plegamiento de las proteínas, sino que también proporcionan protección contra anticuerpos neutralizantes como un "escudo de glucano". Como resultado, la fuerte selección específica para el huésped se asocia frecuentemente con posiciones de codones de glicosilación potencial enlazada a N. Por consiguiente, los sitios de glicosilación enlazados a N tienden a conservarse entre cepas y clados.

Existen tres tipos principales de virus de la gripe: A, B y C. Cepas de virus de la gripe del tipo A pueden provocar enfermedades graves y son el único tipo que han provocado pandemias humanas. La cepa H5N1 es un virus de gripe tipo A. Las cepas de tipo B provocan casos humanos esporádicos y brotes a pequeña escala. Las cepas de tipo C rara vez provocan infección en seres humanos y no han provocado grandes brotes. De los virus de la gripe A, solo los subtipos H1, H2 y H3 se han transmitido fácilmente entre seres humanos.

35 Brotes del virus de la gripe A continúan provocando morbilidad y mortalidad generalizadas en todo el mundo. Solo en los Estados Unidos se estima que entre el 5 y el 20% de la población es infectada anualmente por el virus de la gripe A, provocando aproximadamente 200.000 hospitalizaciones y 36.000 muertes. El establecimiento de políticas integrales de vacunación ha sido una medida efectiva para limitar la morbilidad de la gripe. Sin embargo, la deriva genética frecuente del virus requiere una reformulación anual de la vacuna, lo que conduce en potencia a un desajuste entre la cepa viral presente en la vacuna y la que circula. Por lo tanto, las terapias antivirales contra el virus de la gripe son herramientas importantes para limitar tanto la gravedad como la transmisión de la enfermedad.

40 Los virus H5N1 de la gripe altamente patógenos han provocado brotes en aves de corral y las aves salvajes desde 2003 (Li KS et al (2004) *Nature* 430:209-213). A partir de febrero de 2010, estos virus han infectado no solo a las especies de aves, sino también a más de 478 seres humanos, de los cuales 286 casos resultaron ser mortales ([www.who.int/csr/disease/avian\\_gripe/country/cases\\_table\\_2010\\_02\\_17/en/index.html](http://www.who.int/csr/disease/avian_gripe/country/cases_table_2010_02_17/en/index.html)). El virus H5N1 altamente patógeno y el virus de la gripe A (H1N1) de origen porcino de 2009 han provocado brotes globales y han generado una gran preocupación de que se produzcan cambios adicionales en los virus que provoquen una pandemia mortal (Garten RJ, et al. (2009) *Science* 325:197-201, Neumann G, et al. (2009) *Nature* 459:931-939). Existe una gran preocupación de que un virus de la gripe adquiera la capacidad de propagarse de manera eficiente entre los seres humanos, convirtiéndose así en una amenaza de pandemia. Por lo tanto, una vacuna contra la gripe debe ser una parte integral de cualquier plan de preparación para una pandemia.

50 Los virus de la gripe son virus de ARN segmentados de cadena negativa y pertenecen a la familia Orthomyxoviridae. El virus de la gripe A consiste en 9 proteínas estructurales y codifica adicionalmente una proteína NS1 no estructural con funciones reguladoras. La proteína NS1 no estructural se sintetiza en grandes cantidades durante el ciclo de reproducción y se localiza en el citosol y el núcleo de las células infectadas. La naturaleza segmentada del genoma

viral permite que el mecanismo de reordenamiento genético (intercambio de segmentos del genoma) tenga lugar durante la infección mixta de una célula con diferentes cepas virales. El virus de la gripe A puede clasificarse en diversos subtipos dependiendo de las diferentes proteínas virales hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) que se muestran en su superficie. Subtipos del virus de la gripe A se identifican por dos glicoproteínas de la superficie viral, la hemaglutinina (HA o H) y la neuraminidasa (NA o N). Cada uno de los subtipos de virus de la gripe se identifica por su combinación de proteínas H y N. Existen 16 subtipos de HA conocidos y 9 subtipos de NA conocidos. Los virus de la gripe tipo A pueden infectar a personas, aves, cerdos, caballos y otros animales, pero las aves salvajes son los huéspedes naturales de estos virus. Solo algunos subtipos de la gripe A (es decir, H1N1, H1N2 y H3N2) circulan actualmente entre las personas, pero todas las combinaciones de los subtipos 16 H y 9 NA se han identificado en especies de aves, especialmente en aves acuáticas y aves costeras salvajes. Además, existe una evidencia creciente de que los virus de la gripe H5 y H7 también pueden provocar enfermedades en seres humanos.

La HA del virus de la gripe A comprende dos regiones estructuralmente distintas, a saber, una región de cabeza globular y una región de tallo. La región de cabeza globular contiene un sitio de unión al receptor que es el responsable de la unión del virus a una célula diana y participa en la actividad de hemaglutinación de la HA. La región del tallo contiene un péptido de fusión que es necesario para la fusión de la membrana entre la envoltura viral y una membrana endosómica de la célula y, por lo tanto, se relaciona con la actividad de fusión (Wiley et al., *Ann. Rev. Biochem.*, 56:365-394 (1987)).

Contribuciones importantes para la comprensión de las infecciones por gripe provienen de los estudios sobre la hemaglutinina (HA), una glicoproteína de la capa viral que se une a receptores de glicanos sialilados específicos en el tracto respiratorio, permitiendo que el virus ingrese en la célula (Kuiken T, et al. (2006) *Science* 312:394-397; Maines TR, et al. (2009) *Science* 325:484-487; Skehel JJ, Wiley DC (2000) *Ann Rev Biochem* 69:531-569; van Riel D, et al. (2006) *Science* 312:399-399). Para atravesar la barrera de especies e infectar a la población humana, la HA aviar debe cambiar su preferencia de unión al receptor de un glicano terminalmente sialilado que contiene motivos de ácido siálico enlazados a  $\alpha$ 2,3 (aviar) a  $\alpha$ 2,6 (seres humanos) (Connor RJ, et al. (1994) *Virology* 205:17-23) y este cambio podría producirse a través de solo dos mutaciones, como en la pandemia de 1918 (Tumpey TM, et al. (2007) *Science* 315:655-659). Por lo tanto, comprender los factores que afectan la unión de la gripe a los receptores de glicano es fundamental para desarrollar métodos para controlar cualquier cepa de gripe cruzada futura que tenga una potencial pandemia.

Para hacer frente a la necesidad de hacer una vacuna contra la gripe candidato que pudiera inducir anticuerpos neutralizantes potentes contra cepas divergentes de virus de la gripe H5N1, una vacuna basada en la secuencia consenso de hemaglutinina (HA) H5N1 produjo anticuerpos que neutralizaron un panel de viriones que habían sido pseudotipados con la HA de diversos clados de H5N1. (Chen MW, et al. (2008) *Proc Natl Acad Sci USA* 105:13538-13543).

La HA es una proteína de la transmembrana homotrimérica con un ectodominio compuesto por una cabeza globular y una región de tallo (Kuiken T, et al. (2006) *Science* 312: 394-397). Ambas regiones portan oligosacáridos enlazados a N (Keil W, et al. (1985) *EMBO J* 4:2711-2720), que afectan las propiedades funcionales de HA (Chen ZY, et al. (2008) *Vaccine* 26:361-371; Ohuchi R, et al. (1997) *J Virol* 71:3719-3725). Entre los diferentes subtipos de virus de la gripe A, existe una amplia variación en los sitios de glicosilación de la región de la cabeza, mientras que los oligosacáridos del tallo están más conservados y son necesarios para la actividad de fusión (Ohuchi R, et al. (1997) *J Virol* 71:3719-3725). Los glicanos cercanos a los epítopos de péptidos antigénicos interfieren con el reconocimiento de anticuerpos (Skehel JJ, et al. (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* 81:1779-1783), y los glicanos cercanos al sitio de activación proteolítica de HA modulan la escisión e influyen en la infectividad del virus de la gripe (Deshpande KL et al. (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* 84:36-40). La delección mutacional de los sitios de glicosilación de HA puede afectar a la unión del receptor viral (Gunther I, et al. (1993) *Virus Res* 27:147-160).

Los cambios en la secuencia peptídica en o cerca de sitios de glicosilación puede alterar la estructura 3D de la HA y, por lo tanto, la especificidad y la afinidad de unión al receptor. De hecho, HA de diferentes subtipos de H5N1 tienen diferentes patrones de unión a glicano (Stevens J, et al. (2008) *J Mol Biol* 381:1382-1394). La mutagénesis de los sitios de glicosilación en H1 y H3 se ha estudiado en todo el sistema viral (Chandrasekaran A, et al. (2008) *Nat Biotechnol* 26: 107-113; Deom CM, et al. (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* 83:3771-3775). Sin embargo, no se sabe cómo los cambios en la glicosilación afectan a la especificidad y la afinidad de unión al receptor, especialmente con respecto a la HA H5N1 más patógena.

Vacunas contra la gripe, cuando se preparan, tienen que cambiarse cada año, ya que las regiones de hemaglutinina menos glicosiladas o no glicosiladas continúan mutando para escapar del sistema inmunitario del huésped.

El objetivo de diseñar vacunas contra patógenos heterogéneos es identificar y diseñar antígenos eficaces y ampliamente protectores. En el caso de la gripe, se han realizado esfuerzos históricos considerables en las pruebas

empíricas de secuencias y regiones lineales conservadas con poco éxito. Una razón plausible para estos fracasos es la falta de conocimiento de que las respuestas enfocadas contra los artículos de ensayo antigénicos son sitios productivos de buena fe reales para la neutralización de un antígeno en el patógeno en el contexto de una infección real.

## 5 SUMARIO DE LA INVENCION

10 Específicamente, existe la necesidad de anticuerpos monoclonales de neutralización cruzada que se puedan utilizar en el diseño y la validación de los procedimientos de producción de vacunas que mantengan o potencien la calidad y la antigenicidad de los epítomos de neutralización cruzada en vacunas fabricadas actuales y futuras. Asumiendo que la unión del anticuerpo a la vacuna refleja la integridad estructural y el potencial antigénico, se evaluaría la unión de anticuerpos de neutralización cruzada, tales como los polipéptidos de HA desglicosilados a dichos derivados del proceso de la vacuna para evaluar cuantitativamente su potencial de neutralización cruzada. Para maximizar las respuestas hacia estos epítomos universales, se crearían derivados para aumentar la inmunogenicidad hacia estos epítomos universales.

15 La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Se describe una vacuna que utiliza los principios anteriores. El antígeno se genera separando parcialmente los azúcares de la glicoproteína viral para exponer los sitios de glicosilación (que están altamente conservados y no mutan o no mutan agresivamente) y al mismo tiempo retienen azúcares adecuados para preservar la estructura terciaria de la glicoproteína. Las glicoproteínas virales parcialmente glicosiladas se generan desglicosilando parcialmente las glicoproteínas, de modo que un sitio de glicosilación particular retiene una, dos o tres unidades de azúcar. En algunos aspectos, la glicoproteína  
20 parcialmente glicosilada puede generarse proporcionando una proteína o polipéptido no glicosilado en uno o más sitios de glicosilación particulares y conjugando un mono-, di- o tri-sacárido a los sitios de glicosilación.

25 Se describe una vacuna que comprende al menos una glicoproteína HA, NA o M2 parcialmente glicosilada y un soporte farmacéuticamente aceptable. En algunas implementaciones, la glicoproteína HA parcialmente glicosilada se selecciona del grupo que consiste en el virus de la gripe parcialmente glicosilado H1, H3 y H5. En algunas implementaciones, la glicoproteína HA parcialmente glicosilada se glicosila en los residuos de asparagina en una o más de las posiciones 39, 127, 170, 181, 302, 495 y 500 de HA H5. En algunas implementaciones, el residuo asparagina está en la posición 177.

30 Se describe un método que comprende administrar a un sujeto susceptible de gripe una vacuna que comprende al menos una glicoproteína HA desglicosilada y un soporte farmacéuticamente aceptable. En algunas implementaciones, la glicoproteína HA desglicosilada se selecciona del grupo que consiste en H1, H3 y H5.

35 En algunas implementaciones la desglicosilación deja una monoglicosilación (un azúcar restante) en uno o más sitios de glicosilación de la glicoproteína. En algunas implementaciones, la desglicosilación deja una diglicosilación (2 azúcares restantes) en al menos un sitio de glicosilación en la glicoproteína. En algunas implementaciones, la desglicosilación deja una triglicosilación (3 azúcares restantes) en uno o más sitios de glicosilación en la glicoproteína. En algunas implementaciones, la desglicosilación deja al menos uno de una monoglicosilación, una diglicosilación y una triglicosilación en al menos un sitio de glicosilación en la glicoproteína.

También se describe una composición inmunogénica para elevar una respuesta inmune a un patógeno de origen viral, bacteriano, fúngico o de otro tipo, comprendiendo la composición: una glicoproteína de antígeno del patógeno de origen viral, bacteriano, fúngico o de otro origen, en el que la glicoproteína está parcialmente glicosilada.

40 En algunos aspectos, el patógeno es un virus y el antígeno parcialmente glicosilado es un virus, una partícula similar a virus, un péptido viral, una proteína, un polipéptido o un fragmento del mismo derivado del virus, o una proteína de fusión que comprende parcialmente una secuencia de proteína viral.

45 El virus se selecciona entre virus de la gripe, virus sincitial respiratorio (RSV), clamidia, adenoviridae, mastadenovirus, aviadenovirus, herpesviridae, virus del herpes simplex 1, virus del herpes simplex 2, virus del herpes simplex 5, virus del herpes simplex 6, leviviridae, levivirus, fase MS2 de enterobacteria, alolevirus, poxviridae, chordopoxvirinae, parapoxvirus, avipoxvirus, capripoxvirus, leporiipoxvirus, suipoxvirus, molluscipoxvirus, entomopoxvirinae, papovaviridae, poliomavirus, papilomavirus, paramyxoviridae, paramioxavirus, virus de la parainfluenza 1, mobillivirus, virus del sarampión, rubulavirus, virus de las paperas, pneumovirinae, pneumovirus, virus me tapneumo, pneumovirus aviar, metapneumovirus humano, picornaviridae, enterovirus, rinovirus,  
50 hepatovirus, virus de la hepatitis A humana, cardiovirus y aptovirus, reoviridae, ortoreovirus, orbivirus, rotavirus, cipovirus, fijivirus, fitoreovirus, orizavirus, retroviridae, grupo de retrovirus de tipo B de mamífero, retrovirus de tipo C de mamífero, retrovirus de tipo C de aves, retrovirus de tipo D, retrovirus BLV-HTLV, lentivirus, virus de la inmunodeficiencia humana 1, virus de la inmunodeficiencia humana 2, virus HTLV-I y -II, coronavirus SARS, virus

herpes simplex, virus de Epstein Barr, citomegalovirus, virus de la hepatitis (HCV, HAV, HBV, HDV, HEV), virus toxoplasmagondii, virus de treponema pallidum, virus linfotrópico de células T humano, virus de la encefalitis, virus del Nilo Occidental, virus de Dengue, virus de Varicella Zoster, rubeola, paperas, sarampión alemán, espumavirus, flaviviridae, virus de la hepatitis C, hepadnaviridae, virus de la hepatitis B, togaviridae, alfavirus, virus sindbis, rubivirus, virus del sarampión alemán, rhabdoviridae, vesiculovirus, lisavirus, efemerovirus, citorabdovirus, necleorabdovirus, arenaviridae, arenavirus, virus de la coriomeningitis linfocítica, virus lppy, virus lassa, coronaviridae, coronavirus y torovirus.

El péptido viral, la proteína, el polipéptido o un fragmento del mismo se selecciona de la neuraminidasa del virus de la gripe, hemaglutinina del virus de la gripe, proteínas virales del virus respiratorio sincitial humano (RSV), glicoproteína F del RSV, glicoproteína G de RSV, proteínas virales del virus herpes simplex (HSV), glicoproteínas gB, gC, gD y gE del virus herpes simplex, antígenos MOMP y PorB de clamidia, proteína del núcleo, proteína de la matriz u otra proteína del virus del Dengue, hemaglutinina del virus del sarampión, glicoproteína gB del virus del herpes simplex tipo 2, poliovirus 1 VP1, glicoproteínas de la envoltura del VIH 1, antígeno de superficie de hepatitis B, toxina de la difteria, epítipo del estreptococo 24M, pilina gonocócica, virus de la pseudorrabia g50 (gpD), virus de la pseudorrabia II (gpB), virus de la pseudorrabia III (gpC), glicoproteína H del virus de la pseudorrabia, glicoproteína E del virus de la pseudorrabia, glicoproteína 195 de la gastroenteritis transmisible, proteína de la matriz de gastroenteritis transmisible, glicoproteína 38 del rotavirus porcino, proteína de la cápside del parvovirus porcino, antígeno protector de *Serpulinahydropneumoniae*, glicoproteína 55 de la diarrea viral bovina, hemaglutinina-neuraminidasa del virus de la enfermedad de Newcastle, hemaglutinina de la gripe porcina, neuraminidasa de la gripe porcina, virus de la fiebre aftosa, virus de la cólera porcina, virus de la gripe porcina, virus de la fiebre porcina africana, *Mycoplasma mycoides*, virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina, glicoproteína E del virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina, glicoproteína G, virus de la laringotraqueítis infecciosa, glicoproteína G o glicoproteína I del virus de la laringotraqueítis infecciosa, una glicoproteína del virus de La Crosse, virus de la diarrea neonatal del ternero, virus de la encefalomielitis equina venezolana, virus punta toro, virus de la leucemia murina, virus del tumor mamario murino, proteína del núcleo del virus de la hepatitis B y antígeno de superficie del virus de la hepatitis B o un fragmento o derivado del mismo, antígeno del virus de la gripe equina o virus del herpes equino, incluido el virus de la gripe equina tipo A / neuraminidasa Alaska 91, virus de la gripe equina tipo A / neuraminidasa Miami 63, virus de gripe equina tipo A / glicoproteína B del virus del herpes equino neuraminidasa Kentucky 81 tipo 1 y glicoproteína D del virus del herpes equino tipo 1, antígeno del virus sincitial respiratorio bovino o virus de la parainfluenza bovina, proteína de unión del virus sincitial respiratorio bovino (BRSV G), proteína de fusión del virus sincitial respiratorio bovino (BRSV F), proteína de la nucleocápside del virus sincitial respiratorio bovino (BRSVN), proteína de fusión del virus de la parainfluenza bovina tipo 3, hemaglutinina neuraminidasa del virus de la parainfluenza bovina tipo 3, glicoproteína 48 y glicoproteína 53 del virus de la diarrea viral bovina, glicoproteína del virus del Dengue y glicoproteína E1E2 del virus de la hepatitis C humana.

En algunos aspectos, el antígeno viral desglicosilado es una hemaglutinina mono-, di- o tri-glicosilada del virus de la gripe. En algunas realizaciones, el antígeno viral desglicosilado es una hemaglutinina monoglicosilada seleccionada del grupo que consiste en el virus de la gripe H1, H3 y H5. En algunas realizaciones, la hemaglutinina del virus de la gripe monoglicosilada comprende un sitio de N-glicosilación que comprende una secuencia de aminoácidos de asparagina- $X_{aa}$ -serina y asparagina- $X_{aa}$ -treonina, en donde  $X_{aa}$  es cualquier aminoácido, excepto prolina. En algunos aspectos, la hemaglutinina monoglicosilada que comprende un solo azúcar GlcNAc en un sitio de glicosilación muestra especificidad relajada, pero afinidad potenciada hacia la unión al receptor de HA.

En algunas realizaciones, el antígeno viral desglicosilado es una hemaglutinina di- o tri-glicosilada del virus de la gripe con N-acetilglucosamina (GlcNAc) y/o manosa. En algunos aspectos, el antígeno viral desglicosilado es una hemaglutinina del virus de la gripe monoglicosilada, glicosilada con N-acetilglucosamina (GlcNAc).

En algunos aspectos, la hemaglutinina monoglicosilada del virus de la gripe comprende un polipéptido que comprende una secuencia consenso de HA H5 (SEQ ID NO: 4). En algunas realizaciones, la secuencia consenso HA H5 monoglicosilada (SEQ ID NO: 4) está glicosilada en los residuos de asparagina en una o más de las posiciones 39, 170, 181, 302 y 495. En otros aspectos, la hemaglutinina monoglicosilada del virus de la gripe comprende una secuencia polipeptídica H1 seleccionada del grupo que consiste en una secuencia NIBRG-121 (cepa de vacuna Pandemic 2009 A(H1N1)) (SEQ ID NO: 6), una secuencia consenso H1-A (SEQ ID NO: 8) y una secuencia consenso H1-C (SEQ ID NO: 10). En algunas realizaciones, la secuencia de HA se modifica para permitir la expresión en una célula eucariota adecuada.

En una realización, la hemaglutinina monoglicosilada del virus de la gripe comprende un polipéptido estacional H1 (Brisbane).

También se describe una vacuna que comprende un polipéptido inmunogénico que comprende una glicoproteína viral desglicosilada a un estado de mono-, di-, o tri-glicosilación y, opcionalmente, un adyuvante, en el que la vacuna

es capaz de provocar una respuesta inmune contra un virus respiratorio. En algunas realizaciones, el virus respiratorio es un virus de la gripe y la glicoproteína viral es hemaglutinina (HA).

5 En algunos aspectos, el virus de la gripe se selecciona del grupo que consiste en un virus de la gripe aviar y un virus de la gripe estacional. En algunas realizaciones, el virus de la gripe aviar es H5N1. En algunas realizaciones, el virus de la gripe es el virus de la gripe A.

10 En un aspecto, el virus es el virus sincitial respiratorio (RSV) y el antígeno viral parcialmente glicosilado es un RSV F (fusión), G (fijación) mono-, di-, o tri-glicosilado de glicoproteína SH (pequeña hidrofóbica), o fragmentos inmunogénicos de la misma. En algunas realizaciones, la secuencia de la proteína G del RSV monoglicosilada (SEQ ID NO: 12) está glicosilada parcialmente en los residuos asparagina en uno o más sitios potenciales de N-glicosilación indicados en la Tabla 6.

15 En un aspecto, el virus es un flavivirus, y el antígeno viral parcialmente glicosilado es una glicoproteína mono-, di-, o tri-glicosilada de la envoltura M del virus Dengue, glicoproteína E o fragmentos inmunogénicos de las mismas. En algunas realizaciones, la glicoproteína monoglicosilada de la envoltura del virus Dengue (SEQ ID NO: 13) está parcialmente glicosilada en los residuos asparagina en uno o más sitios de N-glicosilación N67 y N153 indicados en la Tabla 7.

20 En un aspecto, el virus es un virus de la hepatitis C y el antígeno viral parcialmente glicosilado es una glicoproteína E1 mono-, di-, o tri-glicosilada de la envoltura de la hepatitis C, glicoproteína E2 o fragmentos inmunogénicos de las mismas. En algunas realizaciones, la glicoproteína E1 monoglicosilada de la envoltura de hepatitis C (SEQ ID NO: 14) se glicosila parcialmente en los residuos de asparagina en uno o más sitios de N-glicosilación N196, N209, N234, N305 y N325 indicados en la Tabla 8.

En un aspecto, en donde el virus es un virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), y el antígeno viral parcialmente glicosilado es una glicoproteína gp120 mono-, di-, o tri-glicosilada de la envoltura del VIH, glicoproteína gp41 de la membrana o fragmentos inmunogénicos de los mismos.

25 En algunas realizaciones, la glicoproteína gp120 monoglicosilada de la envoltura del VIH (SEQ ID NO: 15) está parcialmente glicosilada en los residuos de asparagina en uno o más sitios potenciales de N-glicosilación indicados en la Tabla 9.

30 También se describe una composición de vacuna que comprende: un polipéptido HA de la gripe, en donde el polipéptido HA de la gripe se desglicosila a un estado de monoglicosilación; y un soporte farmacéuticamente aceptable, en donde tras la introducción del polipéptido HA monoglicosilado en un sujeto, el polipéptido induce al sujeto a producir anticuerpos que se unen al virus de la gripe.

En algunos aspectos, la introducción del polipéptido HA monoglicosilado en el sujeto induce al sujeto a producir anticuerpos que neutralizan tanto el virus de la gripe estacional como aviar.

35 En una realización, la hemaglutinina monoglicosilada del virus de la gripe comprende un polipéptido HA estacional H1 (Brisbane) y tras la introducción del polipéptido HA E mono-glicosilado en un sujeto, el polipéptido HA H1 (Brisbane) induce al sujeto a producir anticuerpos que neutralizan el virus de la gripe NIBRG-121 (cepa de vacuna Pandemic 2009 A(H1N1)).

40 En otra realización, la hemaglutinina monoglicosilada del virus de la gripe comprende un polipéptido NIBRG-121 (cepa de vacuna Pandemic 2009 A(H1N1)) y tras la introducción del polipéptido HA monoglicosilado en un sujeto, el polipéptido NIBRG-121 (cepa de vacuna Pandemic 2009 A(H1N1)) induce al sujeto a producir anticuerpos que neutralizan la HA del virus de la gripe estacional H1 (Brisbane).

En algunos aspectos, la vacuna comprende, además, un adyuvante, que puede seleccionarse de hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, tanto hidróxido de aluminio como fosfato de aluminio, adyuvante incompleto de Freund (IFA), escualeno, escualano, alumbre y MF59.

45 También se describen métodos para la inmunización de un mamífero contra una infección respiratoria viral, comprendiendo el método: administrar al mamífero susceptible a la infección por el virus respiratorio una vacuna que comprende un polipéptido inmunogénico que comprende una glicoproteína viral desglicosilada a un estado de mono-, di- o tri-glicosilación, en donde la vacuna es capaz de provocar una respuesta inmune contra el virus respiratorio. En algunas realizaciones, el virus respiratorio es un virus de la gripe y la glicoproteína viral es hemaglutinina (HA). La vacuna puede administrarse a través de administración parenteral, por medios de inhalación, por vía intranasal y, a veces, profilácticamente.

50

En algunos aspectos, la vacuna provoca una respuesta inmunitaria contra cepas del virus de la gripe que son diferentes de la cepa del virus de la gripe del cual se selecciona la glicoproteína viral desglucosilada. En algunas realizaciones, la glicoproteína viral desglucosilada es una hemaglutinina (HA) monoglicosilada de la gripe.

5 También se describen vacunas eficaces contra el virus de la gripe A. En una realización, la vacuna comprende un péptido o polipéptido que imita funcionalmente a un epítipo de neutralización de una molécula descrita en esta memoria. En otra realización, la vacuna es eficaz contra un antígeno viral que comprende un péptido o polipéptido que imita funcionalmente a un epítipo de neutralización de una molécula descrita en esta memoria. En una realización, el antígeno viral es de un virus de la gripe o un virus VIH-1 o VIH-2, o un flavivirus, tal como el virus Dengue o el virus de la hepatitis C.

10 En otra realización, la vacuna es una vacuna eficaz contra el virus de la gripe A, que comprende un péptido o polipéptido que imita funcionalmente a un epítipo de neutralización de una molécula descrita en esta memoria. En una realización, la molécula es un anticuerpo. En otra realización, el anticuerpo se une a un antígeno HA. En otra realización, el antígeno HA es un subtipo H5. En otra realización, el antígeno HA es un subtipo H1. En otra realización, el antígeno se muestra en la superficie del virus de la gripe A. En otra realización, el péptido o polipéptido comprende determinantes antigénicos que generan anticuerpos neutralizantes.

Estos y otros aspectos resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción de la realización preferida tomada conjuntamente con los dibujos siguientes, aunque pueden verse afectadas variaciones y modificaciones en la misma.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

20 Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente determinados aspectos de la presente divulgación, cuyas invenciones se puede entender mejor por referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas presentadas en esta memoria.

25 Las Figuras 1A-1C muestran vistas generales esquemáticas y espectros de dicroísmo circular de HA con diferentes glicosilaciones. (Fig. 1A) Cuatro variantes de proteínas HA con diferentes glicosilaciones: HA<sub>fg</sub>, HA (una secuencia consenso (Chen MW, et al. (2008) Proc Natl Acad Sci USA 105:13538-13543) expresada en células HEK293E con el típico complejo tipo N-glicanos); HA<sub>ds</sub>, HA tratada con NA que da como resultado la separación de ácidos siálicos de HA<sub>fg</sub>; HA<sub>hm</sub>, HA expresada en células GnTI-HEK293S con los N-glicanos de tipo de alto contenido en manosa; y HA<sub>mg</sub>, HA tratada con endo H con GlcNAc solo en sus sitios de N-glicosilación. (Fig. 1B) Representación estructural de HA<sub>fg</sub>, HA<sub>ds</sub>, HA<sub>hm</sub> y HA<sub>mg</sub> con diferentes N-glicanos unidos en sus sitios de N-glicosilación. Las estructuras de proteínas se crean con el código de ID del Banco de Datos de Proteínas 2FK0 (Viet04 HA), coloreado en gris, y los glicanos enlazados a N se muestran en verde. Todos los N-glicanos son modelados por GlyProt (Bohne-Lang A, et al. (2005) Nucleic Acids Res 33:W214-W219), y los gráficos son generados por PyMOL (www.pymol.org). (Fig. 1C) Los espectros de dicroísmo circular de HA<sub>fg</sub>, HA<sub>ds</sub>, HA<sub>hm</sub> y HA<sub>mg</sub> demuestran que las estructuras secundarias de las cuatro proteínas HA con diferentes glicosilaciones son similares.

35 Las Figs. 2A-2B muestran análisis de micromatrices de glicano de HA con diferentes glicosilaciones. (Fig. 2A) Se muestran perfiles de micromatrices de glicanos de variantes de HA HA<sub>fg</sub>, HA<sub>ds</sub>, HA<sub>hm</sub> y HA<sub>mg</sub>. Los enlaces relacionados de los glicanos se agruparon por colores, predominantemente 17 α2,3 sialósidos (amarillo) o 7 α2,6 sialósidos (azul). Las estructuras de los glicanos en la matriz se indican en la Fig. 2B. Las constantes de asociación de las variantes de HA HA<sub>fg</sub>, HA<sub>ds</sub>, HA<sub>hm</sub> y HA<sub>mg</sub> se muestran con valores de K<sub>A, surf</sub> de variantes de HA en respuesta a los α2,3 sialósidos 1-15.

40 La Fig. 3 muestra el análisis de alineamiento de secuencias de Brisbane H1, California H1, H3 y H5 de HA recientes H1, H3 y H5 desde 2000. La gripe estacional HA es de A/Brisbane/59/2007. La gripe pandémica HA es de A/California/07/2009. H5 es de A/Vietnam/1203/2004. H3 es de A/Brisbane/10/2007. Los sitios de N-glicosilación en HA H5 se muestran en un cuadro rojo. La comparación revela similitud entre los HA H1 y H5 en sus posiciones de N-glicosilación, mientras que H3 tiene posiciones de glicosilación menos conservadas y difiere de H1 y H5.

45 Las Figs. 4A-4F muestran las contribuciones de energía de unión de azúcares o modificaciones de las interacciones de glicano de HA en respuesta a HAs con diferentes glicosilaciones. Estos valores se obtuvieron restando los valores de ΔG del glicano de referencia indicado (resaltado en recuadros rojos; véase la Tabla S3). (Fig. 4A) Los glicanos 2, 3, 6 y 8-10 poseen la misma cadena principal del glicano disacárido 1, pero solo difieren en el tercer azúcar desde el extremo no reductor. Los valores de ΔΔG se calculan para demostrar la diferencia de energía de unión cambiando los terceros azúcares. (Fig. 4B) Los glicanos 10-12 y 15 poseen la misma cadena principal del disacárido glicano 8 pero difieren ya sea alargando la estructura del azúcar linealmente o añadiendo un azúcar

ramificado. (Fig. 4C) Los glicanos 4 y 5 poseen la misma cadena principal del glicano trisacárido 3 pero difieren en la fucosa ramificada o en el grupo sulfato en la tercera posición desde el extremo no reductor. (Fig. 4D) Los glicanos 6 y 7 difieren en el grupo sulfato en la tercera posición desde el extremo no reductor del glicano 7. (Fig. 4E) Los glicanos 13 y 14 son sialósidos biantenarios  $\alpha$ 2,3, pero difieren en el cambio del azúcar interno. (Fig. 4F) Los glicanos 16 y 17 y los sialósidos  $\alpha$ 2,6 (n<sup>o</sup>s 21-27) muestran poca o ninguna unión a HA.

Las Figs. 5A-5D muestran una comparación de HA<sub>fig</sub> y HA<sub>mg</sub> como vacuna. (Fig. 5A) Las uniones entre antisueros de HA<sub>fig</sub> y HA<sub>mg</sub> y varias HAs se analizan mediante ELISA. En comparación con el antisuero HA<sub>fig</sub>, el antisuero HA<sub>mg</sub> muestra una mejor unión a H5 (Vietnam 1194/2004 y CHA5). Además, el antisuero HA<sub>mg</sub> también se une a H1 (California 07/2009 y WSN). (Fig. 5B) Microneutralización del virus H5N1 (NIBRG-14) con antisueros HA<sub>fig</sub> y HA<sub>mg</sub>. En comparación con el antisuero HA<sub>fig</sub>, el antisuero HA<sub>mg</sub> muestra una mejor actividad neutralizante contra la infección por el virus de la gripe para las células MDCK (P <0,0001). (Fig. 5C) Protección de la vacuna contra la exposición a dosis letales del virus H5N1. Ratones BALB/c se inmunizaron con dos inyecciones de la vacuna de proteína HA HA<sub>fig</sub>, HA<sub>mg</sub> y PBS control. Los ratones inmunizados fueron enfrentados intranasalmente a una dosis letal del virus H5N1 (NIBRG-14). Después del enfrentamiento, la supervivencia se registró durante 14 días. (Fig. 5D) La unión del antisuero de conejo de HA<sub>mg</sub> con diferentes HAs por ELISA. El antisuero de conejo contra HA<sub>mg</sub> demostró una fuerte unión a H5 (CHA5 y Vietnam/1194). Además, también se observan interacciones con H5 (Anhui e ID5/2005) y H1 (Nueva Caledonia/1999).

Las Figuras 6A-6C muestran la construcción de la proteína de HA H5, la purificación y el análisis por cromatografía de filtración en gel. (Fig. 6A) El ADN que codifica el ectodominio de HA con alternancia del sitio de escisión se clonó en el vector de expresión de mamífero, pTT (Durocher Y, et al. (2002) Nucleic Acids Res 30:E9), para permitir la secreción eficiente de proteínas HA de cultivos celulares HEK293. El sitio de escisión de la proteasa original de la HA fue mutado a PQRERG para evitar el procesamiento de la HA0 en HA1 y HA2. Para estabilizar la conformación trimérica de las proteínas HA, la secuencia "foldon", que es el fragmento trimerizante de bacteriófagos, se modificó en la construcción del plásmido, y también se añadió una etiqueta His en el extremo COOH para fines de purificación. La expresión de proteínas HA se realizó mediante transfección transitoria con el vector de expresión. (Fig. 6B) Las proteínas HA purificadas se analizaron por SDS/PAGE. M indica marcador. Pista 1: HA<sub>fig</sub>, la HA purificada de células 293E; pista 2: HA<sub>ds</sub>, HA<sub>fig</sub> digerida por NA; pista 3: HA<sub>hm</sub>, la HA purificada de células 293S (Reeves PJ, et al. (2002) Proc Natl Acad Sci USA 99:13419-13424); pista 4: HA<sub>mg</sub>, HA<sub>hm</sub> digerida por Endo H. (Fig. 6C) Las proteínas purificadas por HA se analizaron por cromatografía de filtración en gel. El pico eluido mostró el trímero de HA<sub>fig</sub> > 200 kDa (línea roja), el trímero de HA<sub>ds</sub> > 200 kDa (línea negra), el trímero de HA<sub>hm</sub> > 200 kDa (línea azul) y el trímero HA<sub>mg</sub> >180 kDa después de la filtración en gel (línea verde). La figura presenta perfiles de elución superpuestos de proteínas HA superpuestas con marcador de proteína (línea discontinua).

Las Figs. 7A-7C muestran análisis de espectrometría de masas de N-glicanos permetilados de diferentes proteínas HA. Análisis MS de N-glicanos permetilados de diferentes proteínas HA. (Fig. 7A) El perfil MALDI-MS mostró que los N-glicanos de HA expresados a partir de HEK293E comprenden estructuras de N-glicano de tipo complejo predominantemente fucosiladas, biantenarias, triantenarias y tetra-antenarias, tal como se comentó para los picos principales detectados y listados en Tabla S1. La asignación se basa en la composición, con solo unos pocos verificados por análisis MS/MS. El diverso grado de sialilación es una característica principal. (Fig. 7B) Con el tratamiento con NA, todas las señales asignadas como N-glicanos sialilados (p. ej., m/z 2605, 3054, 3503, 3864, 4226) ya no se detectaron, concomitante con un incremento en las intensidades de señal para las estructuras triantenarias y tetra-antenarias no sialiladas (m/z 2693, 3142), totalmente compatibles con la separación completa de los ácidos siálicos. (Fig. 7C) El perfil MALDI-MS de los N-glicanos derivados de HA expresados en la cepa HEK293S deficiente en GnTII mostró predominantemente una señal correspondiente a Man5GlcNAc2 a m/z 1579, junto con N-glicanos de tipo de alto contenido en cortados de manera incompleta manosa (m/z 1783 a 2396; Hex6HexNAc2-Hex9HexNAc2) en la vía de glicosilación.

Las Figs. 8A-8D muestran análisis MALDI-TOF de variantes de HA. Los pesos moleculares de (Fig. 8A) HA<sub>fig</sub> son 75186,343, de (Fig. 8B) HA<sub>ds</sub> son 75290,023, de (Fig. 8C) HA<sub>hm</sub> son 69314,645 y (Fig. 8D) HA<sub>mg</sub> son 63314,761.

La Fig. 9 muestra las asignaciones de iones moleculares principales observados en espectros MALDI de N-glicanos permetilados de trímeros de HA. ND indica no determinado.

La Fig. 10 muestra el  $\Delta\Delta G$  de variantes glicosiladas de HA en respuesta a los sialósidos  $\alpha$ 2,3 1-15. Los valores representan  $\Delta\Delta G$ , kcal/mol. Las entradas en la columna de más a la izquierda se obtuvieron restando los valores de  $\Delta G$  de la última HA de la HA anterior (p. ej.,  $\Delta\Delta G$  (HA<sub>fig</sub> -> HA<sub>ds</sub>) =  $\Delta G$ (HA<sub>ds</sub>) -  $\Delta G$ (HA<sub>fig</sub>)). ND indica no determinado.

La Fig. 11 muestra diferencias en los cambios de energía libre de unión entre diferentes ligandos de sialósidos en respuesta a variantes de HA. Los valores representan  $\Delta\Delta G$ , kcal/mol. Las entradas en la columna de más a la

izquierda se obtuvieron restando los valores de  $\Delta G$  de la última HA de la HA anterior (p. ej.,  $\Delta\Delta G (1 \rightarrow 2) = \Delta G(2) - \Delta G(1)$ ). ND indica no determinado).

5 La Fig. 12 muestra la capacidad de los antisueros generados a partir de HA H5 totalmente glicosilada, con alto contenido en manosa y monoglicosilada de inhibir la transducción del virus pseudotipado Vietnam 1203 HA en células HEK293. Tanto los antisueros de HA con alto contenido en manosa como los monoglicosilados inhiben la entrada del virus, pero los antisueros de HA totalmente glicosilados no lo hacen.

10 Las Figs. 13A-13B muestran los resultados del ensayo de hemaglutinación con antisueros HA<sub>fg</sub> y HA<sub>mg</sub> de conejo. La Fig. 13A muestra resultados con antisueros de consenso HA H5 totalmente glicosilados en ensayos de hemaglutinación hacia H1, H3 y H5. La Fig. 13B muestra los resultados con antisueros de HA H5 monoglicosilados. Los antisueros de HA H5 monoglicosilados no solo muestran una buena actividad de inhibición de la hemaglutinación hacia H5, sino también hacia H1. La hemaglutinación H3 no se ve afectada por ninguno de los antisueros.

La Fig. 14 muestra que las estructuras de proteínas de H5 y H1 son más similares entre sí (desviación cuadrática media (RMSD) de 0,9 Å) que a H3 (desviación cuadrática media (RMSD) de 2,5 Å).

15 Las Figs. 15A-15C muestran la inhibición de NIBRG-121 (cepa de vacuna Pandemic 2009 A (H1N1)) por parte de antisueros generados utilizando HA monoglicosilada H1 (Brisbane) como antígeno. La Fig. 15A muestra la inhibición de la capacidad del virus NIBRG-121 (cepa de vacuna Pandemic 2009 A(H1N1)) para aglutinar glóbulos rojos. La Fig. 15B muestra la inhibición de la capacidad del virus NIBRG-121 (cepa de vacuna Pandemic 2009 A(H1N1)) para infectar células MDCK. La Figura 15C muestra la protección de ratones BALB/c contra la infección por el virus de la gripe NIBRG-121 (cepa de vacuna Pandemic 2009 A(H1N1)). El antisuero utilizado fue ratones inmunizados con proteínas HA de Brisbane (5 µg) y el virus utilizado para el enfrentamiento fue NIBRG-121 (100x DL<sub>50</sub>).

20

25 Las Figs. 16A-16C muestran la inhibición de WSN (H1N1) 1933 por parte de antisueros generados utilizando HA monoglicosilada H1 (Brisbane) como antígeno. La Fig. 16A muestra la inhibición de la capacidad del virus WSN (H1N1) 1933 para aglutinar glóbulos rojos. La Fig. 16B muestra la inhibición de la capacidad del virus WSN (H1N1) 1933 para infectar células MDCK. La Figura 16C muestra la protección de ratones BALB/c contra la infección por el virus de la gripe WSN (H1N1) 1933. El antisuero utilizado fue ratones inmunizados con proteínas HA de Brisbane (5 µg) y el virus utilizado para el enfrentamiento fue WSN (H1N1) 1933 (100x DL<sub>50</sub>).

30 Las Figs. 17A-17C muestran la inhibición de A/Puerto Rico/8/34 (H1N1): PR8 por antisueros generados utilizando HA monoglicosilada H1 (Brisbane) como antígeno. La Fig. 17A muestra la inhibición de la capacidad del virus PR8 para aglutinar glóbulos rojos. La Fig. 17B muestra la inhibición de la capacidad del virus PR8 para infectar células MDCK. La Figura 17C muestra la protección de ratones BALB/c contra la infección por el virus de la gripe PR8. El antisuero utilizado fue ratones inmunizados con proteínas HA de Brisbane (5 µg) y el virus utilizado para la exposición fue PR8 (100x DL<sub>50</sub>).

35 Las Figs. 18A-18B muestran la inhibición de WSN (H1N1) por antisueros generados utilizando la cepa de vacuna HA monoglicosilada H1 (Pandemic 2009 A(H1N1)); se muestra en la figura como California/2009) como antígeno. La Fig. 18A muestra la inhibición de la capacidad del virus WSN (H1N1) para aglutinar glóbulos rojos. La Fig. 18B muestra la inhibición de la capacidad del virus WSN (H1N1) para infectar células MDCK.

La Fig. 19 muestra la comparación estructural de los sitios de glicosilación en la proteína HA H1.

40 La Fig. 20 muestra dímeros de la glicoproteína E de la envoltura del virus Dengue tipo 3 en forma totalmente glicosilada (Fig. 20A) y en forma monoglicosilada (Fig. 20B). Los modelos se crearon a partir del código PDB 1UZG, con 4 posibles N-glicanos de tipo complejo con el servidor GlyProt.

La Fig. 21 muestra los trímeros de la glicoproteína gp120 de la envoltura del virus de inmunodeficiencia humana en forma completamente glicosilada (Fig. 21A) y en forma monoglicosilada (Fig. 21B). Los modelos se crearon a partir del código PDB 2BF1, con 13 posibles N-glicanos de tipo complejo por monómero.

#### 45 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

En la siguiente descripción detallada de realizaciones de la presente divulgación se hace referencia a los dibujos adjuntos en los que referencias iguales indican elementos similares, y en la que se muestran a modo de ilustración realizaciones específicas en las que se puede poner en práctica la presente divulgación. Estas realizaciones se describen con suficiente detalle para permitir a los expertos en la técnica poner en práctica la presente divulgación, y se debe entender que se pueden utilizar otras realizaciones y que se pueden realizar cambios lógicos, estructurales,

50

funcionales y de otro tipo sin apartarse del alcance de la presente divulgación. Por lo tanto, la siguiente descripción detallada no debe tomarse en un sentido limitante.

La hemaglutinina (HA) del virus de la gripe es una proteína de la transmembrana homotrimérica con un ectodominio compuesto por una cabeza globular y una región del tallo. Ambas regiones portan oligosacáridos enlazados a N, cuya biosíntesis sigue las vías generales de la glicosilación de N. Las propiedades funcionales de HA se ven afectadas por la glicosilación en sitios específicos. Los hidratos de carbono alrededor de los epítopos de péptidos antigénicos interfieren con el acceso de anticuerpos, y este efecto puede dar lugar a la deriva antigénica del virus de la gripe. Estudios previos sobre las HAs también revelaron que las secuencias peptídicas con glicosilación están altamente conservadas, y la especificidad de unión al receptor de HA se vio afectada por la ausencia de una cadena de glicano compleja cerca del sitio de unión al receptor. Además, la activación proteolítica de HA también fue modulada por los glicanos cerca del sitio de escisión para influir en la infectividad del virus de la gripe. Las amplias variaciones en la estructura y el número de sitios de glicosilación en la región de la cabeza se han demostrado entre diferentes subtipos de los virus de la gripe A, mientras que los oligosacáridos del tallo estaban más conservados y se requerían para la actividad de fusión. Todos estos hallazgos han indicado la importancia de la glicosilación de HA en su actividad.

La transmisión viral comienza con una interacción crítica entre la glicoproteína hemaglutinina (HA), que está en la cubierta viral de la gripe, y el ácido siálico (SA) que contiene glicanos, que están en la superficie de la célula huésped. Para dilucidar el papel de la glicosilación de HA en esta importante interacción, se prepararon diversas glicofomas de HA definidas y se estudió su afinidad y especificidad de unión utilizando una micromatriz de SA sintética. El truncamiento de las estructuras de N-glicano en HA aumentó las afinidades de unión de SA, al tiempo que disminuyó la especificidad hacia ligandos de SA dispareos. La contribución de cada uno de los grupos monosacáridos y sulfato dentro de las estructuras del ligando SA a la energía de unión a HA se diseccionó cuantitativamente. Se descubrió que el grupo sulfato añade casi 100 veces (2,04 kcal/mol) en energía de unión a la HA completamente glicosilada, y también lo hace el glicano biantenarico a la glicofoma de HA monoglicosilada. Los anticuerpos producidos contra la proteína HA que portaba solo una GlcNAc enlazada a N en cada uno de los sitios de glicosilación mostraron una mejor afinidad de unión y actividad de neutralización contra los subtipos de la gripe que las HAs totalmente glicosiladas obtenidas. Por lo tanto, la separación de glicanos estructuralmente no esenciales en las glicoproteínas de la superficie viral es un enfoque muy efectivo y general para el diseño de vacunas contra la gripe y otros virus humanos.

A menos que se defina lo contrario, las expresiones y los términos técnicos y científicos utilizados en esta memoria tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto ordinario en la técnica a la que pertenece esta invención. Singleton et al., *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology* 2<sup>a</sup> ed., J. Wiley & Sons (Nueva York, NY 1994), proporciona a un experto en la técnica una guía general de muchos de los términos y expresiones utilizados en la presente solicitud.

Un experto en la técnica reconocerá muchos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en esta memoria que podrían ser utilizados en la práctica de la presente invención. De hecho, la presente invención no se limita de modo alguno a los métodos y materiales descritos. Para los fines de la presente invención, se definen a continuación los siguientes términos y expresiones.

Las expresiones "subtipo de la gripe A" o "subtipo del virus de la gripe A" se utilizan indistintamente, y se refieren a variantes del virus de la gripe A que se caracterizan por una proteína hemaglutinina (H) de la superficie viral y, por lo tanto, son etiquetados por un número H, tal como, por ejemplo, H1, H3 y H5. Además, los subtipos pueden caracterizarse adicionalmente por una proteína neuraminidasa (N) de la superficie viral, indicada por un número N, tal como, por ejemplo, N1 y N2. Como tal, se puede hacer referencia a un subtipo con números H y N, tales como, por ejemplo, H1N1, H5N1 y H5N2. Los términos incluyen específicamente todas las cepas (incluidas las cepas extintas) dentro de cada uno de los subtipos, que habitualmente resultan de mutaciones y muestran diferentes perfiles patogénicos. A cepas de este tipo también se las alude como diversos "aislados" de un subtipo viral, incluidos todos los aislados pasados, presentes y futuros. Por consiguiente, en este contexto, los términos "cepa" y "aislado" se utilizan indistintamente. Los subtipos contienen antígenos basados en un virus de la gripe A. Los antígenos pueden basarse en una proteína hemaglutinina de la superficie viral y pueden designarse como "antígeno HA". En algunos casos, dichos antígenos se basan en la proteína de un subtipo particular, tal como, por ejemplo, un subtipo H1 y un subtipo H5, que pueden designarse como un antígeno H1 y un antígeno H5, respectivamente.

Tal como se utiliza en la presente divulgación, el término proteína "desglicosilada" o la expresión proteína "parcialmente glicosilada" designa una proteína que tiene uno o más azúcares separados de la estructura de glicano de un caso totalmente glicosilado de la proteína y en la que la proteína retiene sustancialmente su conformación/plegamiento nativo. Una proteína "desglicosilada" incluye una proteína parcialmente glicosilada, en la

cual el proceso de desglicosilación deja una monoglicosilación, una diglicosilación o una triglicosilación en uno o más sitios de glicosilación presentes en la glicoproteína.

Una proteína "glicosilada parcialmente" incluye una proteína "desglicosilada" en la que uno o más azúcares quedan retenidos en cada uno de los sitios de glicosilación, y cada uno de los sitios parcial contiene una estructura de glicano más pequeña (que contiene un menor número de unidades de azúcar) en comparación con el sitio en un caso completamente glicosilado de la glicoproteína, y la proteína parcialmente glicosilada retiene sustancialmente su conformación/plegamiento nativo. Se genera una proteína "parcialmente glicosilada" por desglicosilación parcial de la estructura de glicano de al menos un sitio de glicosilación de un caso completamente glicosilado de la glicoproteína. También se genera una proteína "parcialmente glicosilada" al introducir la glicosilación en un sitio no glicosilado de una proteína, de manera que la secuencia de glicosilación añadida es más pequeña que la estructura de glicano en ese sitio en un caso de la glicoproteína completamente glicosilada. También se genera una proteína "parcialmente glicosilada" sintetizando una secuencia de glicoproteína viral, o un fragmento de la misma, introduciendo unidades de aminoácidos glicosilados (p. ej., restos de GlcNAc-arginina) en los sitios de glicosilación de la secuencia, de modo que la estructura de glicano añadida es más pequeña que la estructura de glicano en ese sitio en un caso completamente glicosilado de la glicoproteína.

La expresión "ácido nucleico" y el término "polinucleótido" se utilizan indistintamente en esta memoria para referirse a un ARN, ADN de cadena sencilla o de doble cadena, o a polímeros mixtos. Los polinucleótidos pueden incluir secuencias genómicas, secuencias extra-genómicas y de plásmidos, y segmentos genéticos modificados más pequeños que expresan o pueden adaptarse para expresar polipéptidos.

Un "ácido nucleico aislado" es un ácido nucleico que está sustancialmente separado de otras secuencias de ADN del genoma, así como proteínas o complejos tales como ribosomas y polimerasas, que acompañan de forma natural a una secuencia nativa. La expresión abarca una secuencia de ácido nucleico que ha sido separada de su entorno natural e incluye aislados de ADN recombinantes o clonados y análogos sintetizados químicamente o análogos sintetizados biológicamente por sistemas heterólogos. Un ácido nucleico sustancialmente puro incluye formas aisladas del ácido nucleico. Por supuesto, esto se refiere al ácido nucleico tal como se aisló originalmente y no excluye genes o secuencias añadidas posteriormente al ácido nucleico aislado por la mano del hombre.

El término "polipéptido" se utiliza en su significado convencional, *es decir*, como una secuencia de aminoácidos. Los polipéptidos no están limitados a una longitud específica del producto. Péptidos, oligopéptidos y proteínas se incluyen dentro de la definición de polipéptido, y dichos términos pueden utilizarse indistintamente en esta memoria a menos que se indique específicamente lo contrario. Este término tampoco se refiere o excluye modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido, por ejemplo, glicosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones y similares, así como otras modificaciones conocidas en la técnica, tanto naturales como no naturales. Un polipéptido puede ser una proteína entera, o una subsecuencia de la misma. Polipéptidos particulares de interés en el contexto de esta invención son subsecuencias de aminoácidos que comprenden CDRs y que son capaces de unirse a un antígeno o célula infectada por VIH.

Un "polipéptido aislado" es uno que ha sido identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. En realizaciones preferidas, el polipéptido aislado se purificará (1) a más del 95% en peso de polipéptido según se determina por el método de Lowry, y lo más preferiblemente más del 99% en peso, (2) en un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta homogeneidad por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras o no reductoras utilizando azul Coomassie o, preferiblemente, tinción de plata. El polipéptido aislado incluye el polipéptido *in situ* dentro de células recombinantes, ya que no estará presente al menos un componente del entorno natural del polipéptido. Normalmente, sin embargo, el polipéptido aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

Un polinucleótido de "secuencia nativa" es uno que tiene la misma secuencia de nucleótidos que un polinucleótido derivado de la naturaleza. Un polipéptido de "secuencia nativa" es uno que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un polipéptido (*p. ej.*, anticuerpo) derivado de la naturaleza (*p. ej.*, de cualquier especie). Polinucleótidos y polipéptidos de secuencia nativa de este tipo pueden aislarse de la naturaleza o pueden producirse por medios recombinantes o sintéticos.

Un polinucleótido "variante", tal como se utiliza el término en esta memoria, es un polinucleótido que típicamente difiere de un polinucleótido descritos específicamente en esta memoria en una o más sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones. Dichas variantes pueden producirse de forma natural o pueden generarse sintéticamente, por ejemplo, modificando una o más de las secuencias de polinucleótidos de la invención y evaluando una o más actividades biológicas del polipéptido codificado tal como se describe en esta memoria y/o utilizando cualquiera de una serie de técnicas bien conocidas en la técnica.

Un polipéptido "variante", tal como se utiliza el término en esta memoria, es un polipéptido que típicamente se diferencia de un polipéptido descrito específicamente en esta memoria en una o más sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones. Dichas variantes producirse de forma natural o pueden generarse sintéticamente, por ejemplo, modificando una o más de las secuencias de polipéptidos anteriores de la invención y evaluando una o más actividades biológicas del polipéptido tal como se describe en esta memoria y/o utilizando cualquiera de una serie de técnicas bien conocidas en la técnica.

Se pueden hacer modificaciones en la estructura de los polinucleótidos y polipéptidos de la presente invención y se seguirá obteniendo una molécula funcional que codifica una variante o polipéptido derivado con características deseables. Cuando se desea alterar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido para crear un equivalente o incluso una variante o porción mejorada de un polipéptido de la invención, un experto en la técnica cambiará típicamente uno o más de los codones de la secuencia de ADN codificante.

Por ejemplo, determinados aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos en una estructura proteica sin pérdida apreciable de su capacidad para unirse a otros polipéptidos (*p. ej.*, antígenos) o células. Dado que es la capacidad de unión y la naturaleza de una proteína lo que define la actividad funcional biológica de esa proteína, se pueden realizar determinadas sustituciones de secuencia de aminoácidos en una secuencia de proteína y, en su secuencia codificante de ADN subyacente y, no obstante, obtener una proteína con propiedades similares. Por lo tanto, se contempla que se pueden hacer diversos cambios en las secuencias peptídicas de las composiciones descritas o las secuencias de ADN correspondientes que codifican dichos péptidos sin pérdida apreciable de su utilidad o actividad biológica.

Al hacer tales cambios, puede considerarse el índice hidropático de los aminoácidos. La importancia del índice hidropático de aminoácidos para conferir una función biológica interactiva a una proteína se entiende generalmente en la técnica (Kyte y Doolittle, 1982). Se acepta que el carácter hidropático relativo del aminoácido contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, que a su vez define la interacción de la proteína con otras moléculas, por ejemplo, enzimas, sustratos, receptores, ADN, anticuerpos, antígenos, y similares. A cada uno de los aminoácidos se le ha asignado un índice hidropático sobre la base de sus características de hidrofobicidad y carga (Kyte y Doolittle, 1982). Estos valores son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5). Se sabe en la técnica que determinados aminoácidos pueden estar sustituidos con otros aminoácidos que tienen un índice o puntuación hidropático similar y todavía dan como resultado una proteína con actividad biológica similar, *es decir*, todavía se obtiene una proteína biológicamente funcionalmente equivalente. Al realizar tales cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos, cuyos índices hidropáticos están dentro de  $\pm 2$ , aquellos dentro de  $\pm 1$  son particularmente preferidos, y aquellos dentro de  $\pm 0,5$  son aún más particularmente preferidos.

También se entiende en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares puede realizarse eficazmente en base a la hidrofilia. La patente de EE.UU. 4.554.101 establece que la mayor hidrofilia media local de una proteína, según se rige por la hidrofilia de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con una propiedad biológica de la proteína. Tal como se detalla en la Patente de EE.UU. 4.554.101, los siguientes valores de hidrofilia se han asignado a residuos de aminoácidos: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0  $\pm$  1); glutamato (+3,0  $\pm$  1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5  $\pm$  1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4). Se entiende que un aminoácido puede ser sustituido con otro que tenga un valor de hidrofilia similar y todavía se obtiene una proteína biológicamente equivalente y, en particular, una proteína inmunológicamente equivalente. En cambios de este tipo se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofilia están dentro de  $\pm 2$ , aquellos dentro de  $\pm 1$  son particularmente preferidos, y aquellos dentro de  $\pm 0,5$  son aún más particularmente preferidos.

Tal como se indica anteriormente, las sustituciones de aminoácidos se basan, por lo tanto, generalmente en la similitud relativa de los sustituyentes de la cadena lateral del aminoácido, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofiliidad, carga, tamaño, y similares. Sustituciones a modo de ejemplo que toman en consideración varias de las características anteriores son bien conocidas por los expertos en la técnica e incluyen: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina.

Los polipéptidos pueden comprender una secuencia señal (o conductora) en el extremo N-terminal de la proteína, que dirige la transferencia de la proteína de forma co-traducciona l o post-traducciona l. El polipéptido también puede conjugarse con un enlazador u otra secuencia para facilitar la síntesis, purificación o identificación del polipéptido (*p. ej.*, poli-His), o para potenciar la unión del polipéptido a un soporte sólido.

La glicosilación de polipéptidos está típicamente enlazada a N o enlazada a O. Enlazada a N se refiere a la unión del resto hidrato de carbono a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Un "sequon" es una secuencia de tres aminoácidos consecutivos en una proteína que puede servir como sitio de unión a un polisacárido (azúcar) denominado glicano enlazado a N. Éste es un polisacárido enlazado a la proteína a través del átomo de nitrógeno en la cadena lateral de la asparagina (Asn). Un sequon es Asn-X<sub>aa</sub>-Ser o Asn-X<sub>aa</sub>-Thr, en donde X<sub>aa</sub> es cualquier aminoácido excepto prolina. Por lo tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptidos en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La glicosilación enlazada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un ácido hidroxiamino, más comúnmente serina o treonina, aunque también se puede utilizar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina. Si bien el sequon Asn-X-Ser/Thr es absolutamente necesario para la unión de oligosacáridos enlazados a N a una glicoproteína (Marshall RD, *Biochemical Society Symposia* 40, 17-26 1974), su presencia no siempre resulta en la glicosilación y algunos sequones en glicoproteínas pueden permanecer sin glicosilar. (Curling EM, et al., *Biochemical Journal* 272, 333-337 1990)

La micromatriz de glicano es una herramienta poderosa para la investigación de las interacciones hidratos de carbono-proteínas y proporciona una nueva plataforma para la subtipificación del virus de la gripe (Blixt O, et al (2004) *Proc Natl Acad Sci USA* 101:17033-17038; Chandrasekaran A, et al. (2008) *Nat Biotechnol* 26:107-113; Liang PH, et al. (2007) *J Am Chem Soc* 129:11177-11184; Stevens J, et al. (2008) *J Mol Biol* 381:1382-1394). Imitan los glicanos en la superficie celular para exhibir interacciones multivalentes con alta afinidad y especificidad. Utilizando esta tecnología, se realizó la caracterización de la especificidad del receptor de diversas HA nativas y mutantes que proporcionan una nueva plataforma para diferenciar los subtipos de virus de la gripe.

Aunque un método poderoso, el entender las interacciones HA-glicano mediante análisis de la matriz de glicano se ha complicado por dos cuestiones: En primer lugar, la especificidad de unión a HA se ve afectada por la disposición espacial y la composición de los glicanos dispuestos y el método de detección de unión utilizado (Srinivasan A, et al. (2008) *Proc Natl Acad Sci USA* 105:2800-2805). En segundo lugar, los cambios en la secuencia de péptidos en o cerca de los sitios de glicosilación pueden alterar la estructura 3D de la HA y, por lo tanto, la especificidad y afinidad de unión al receptor. De hecho, HAs de diferentes subtipos H5N1 tienen diferentes patrones de unión a glicano (Stevens J, et al. (2008) *J Mol Biol* 381:1382-1394). La mutagénesis de los sitios de glicosilación en H1 y H3 se ha estudiado en todo el sistema viral (Chandrasekaran A, et al. (2008) *Nat Biotechnol* 26:107-113; Deom CM, et al. (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* 83:3771-3775). Sin embargo, no se sabe cómo los cambios en la glicosilación afectan a la especificidad y la afinidad de unión al receptor, especialmente con respecto a la HA H5N1 más patógena. Para abordar estos problemas, se desarrolló un método de análisis cuantitativo de micromatrices de glicanos para superar las limitaciones de los experimentos tradicionales de unión a HA.

Estudios anteriores han utilizado HA de expresión de células de insecto (Chandrasekaran A, et al (2008) *Nat Biotechnol*. 26:107-113). Sin embargo, la glicosilación en las células de insectos difiere de las células de mamíferos, siendo una marcada diferencia el que los N-glicanos de tipo complejo que terminan en galactosa y ácido siálico no se producen en las células de insectos.

#### Variantes glicosiladas de HA expresadas a partir de células humanas

Para examinar cómo los cambios en la glicosilación afectan al receptor de la especificidad de unión y afinidad en células humanas, una micromatriz de glicano que comprende análogos estructurales extensivos del ligando de unión a HA, y varias glicofomas definidas de HA se prepararon mediante el uso de la secuencia consenso de HA H5N1 de la gripe (Chen MW, et al. (2008) *Proc Natl Acad Sci USA* 105:13538-13543) para análisis de unión cuantitativa.

Los codones de CHA5 fueron optimizados para la expresión mediante el uso de codones humanos. Tal como se muestra en la Tabla 1, el sitio de escisión de proteasa viral original PQRERRRKKRG (SEQ ID NO: 1) fue mutado a PQRERG (SEQ ID NO: 2) con el fin de evitar que las proteínas de la escisión enzimática formen HA1 y HA2. La región de transmembrana (residuos: 533-555) fue reemplazada por los residuos adicionales LVPRGSP GSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEVNLLSTFLG **HHHHHH** (SEQ ID NO: 3) en el extremo C terminal de la construcción HA, donde el sitio de escisión de trombina está en cursiva, la secuencia de trimerización de foldon de la fibritina del bacteriófago T4 está subrayada, y la etiqueta His está en negrita (Stevens J. et al. (2006) *Science* 312: 404-410).

# ES 2 784 189 T3

Tabla 1. Secuencia consenso de hemaglutinina H5

<p>Secuencia de aminoácidos de consenso de HA H5 mostrado en <b>negrita</b>: secuencia señal; y <u>subrayado</u>: secuencia de trimerización y etiqueta His.</p>	
<p><b><u>MEKIVLLFAIVSLVKSDQICI</u></b>GS</p>	<p>HANNSTEQVDTIMEKNVTVTHAQDILE 50</p> <p>KTHNGKLCDDLGDGKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFINVPEWSYIVEKAN 100</p> <p>PANDLCYPGDFNDYEELKHLLSRINHFEKIQIIPKSSWSSEASSGVSSA 150</p> <p>CPYQGKSSFFRNVVWLIIKKNSTYPTIKRSYNNNTNQEDLLVLWGIHHPNDA 200</p> <p>AEQTKLYQNPTTYISVGTSTLNQRLVPKIATRISKVNGQSGRMEFFWTILK 250</p> <p>PNDAINFESNGNFIAPEYAYKIVKKG DSTIMKSELEYGNCNTKCQTPMGA 300</p> <p>INSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKGNRLVATGLFNSPQRERGLFGAIAGF 350</p> <p>IEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSGYAADKESTQKAIDGVTNKVNSIIDKM 400</p> <p>NTQFEAVGREFNNLERRIENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMENERLD 450</p> <p>FHDSNVKNLYDKVRLQLRD NAKELGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDY 500</p> <p>PQYSEEARLKREEISGVD<u>IRSLVPRGSPGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEW</u> 550</p> <p><u>VLLSTFLGHHHHH</u></p> <p>(SEQ ID NO: 4)</p>
<p><b>Secuencia de nucleótidos de consenso de HA H5</b></p>	
<p>1</p> <p>51</p> <p>101</p> <p>151</p> <p>201</p> <p>251</p> <p>301</p> <p>351</p> <p>401</p> <p>451</p> <p>501</p> <p>551</p> <p>601</p> <p>651</p> <p>701</p> <p>751</p> <p>801</p> <p>851</p> <p>901</p> <p>951</p> <p>1001</p> <p>1051</p> <p>1101</p> <p>1151</p>	<p>ATG GAGAAGA TCGTGTGCT GTTCGCCATC GTGAGCCTGG TGAAGAGCGA</p> <p>CCAGATCTGC ATCGGATCCC ACGCCAACAA CAGCACCAGAG CAGGTGGACA</p> <p>CCATCATGGA GAAGAACGTG ACCGTGACCC ACGCCCAGGA CATCCTGGAG</p> <p>AAGACCCACA ACGGCAAGCT GTGCGACCTG GACGGCGTGA AGCCTCTGAT</p> <p>CCTGAGAGAG TGCAGCGTGG CCGGCTGGCT GCTGGGCAAC CCTATGTGCG</p> <p>ACGAGTTTCA CAACGTGCCT GAGTGGAGCT ACATCGTGA GAAGGCCAAC</p> <p>CCTGCCAACG ACCTGTGCTA CCCTGGCGAC TTCAACGACT ACGAGGAGCT</p> <p>GAAGCACCTG CTGAGCAGAA TCAACCACTT CGAGAAGATC CAGATCATCC</p> <p>CTAAGAGCAG CTGGAGCAGC CACGAGGCCA GCAGCGGCGT GAGCAGCGCC</p> <p>TGCCCTTACC AGGGCAAGAG CAGCTTCTTC AGAAACGTGG TGTGGCTGAT</p> <p>CAAGAAGAAC AGCACCTACC CTACCATCAA GAGAAGCTAC AACAACACCA</p> <p>ACCAGGAGGA CCTGCTGGTG CTGTGGGGCA TCCACCACCC TAACGACGCC</p> <p>GCCGAGCAGA CCAAGCTGTA CCAGAACCCT ACCACCTACA TCAGCGTGGG</p> <p>CACCAGCACC CTGAACCAGA GACTGGTGCC TAAGATCGCC ACCAGAAGCA</p> <p>AGGTGAACGG CCAGAGCGGC AGAATGGAGT TCTTCTGGAC CATCCTGAAG</p> <p>CCTAACGACG CCATCAACTT CGAGAGCAAC GGCAACTTCA TCGCCCCTGA</p> <p>GTACGCCTAC AAGATCGTGA AGAAGGGCGA CAGCACCATC ATGAAGAGCG</p> <p>AGCTGGAGTA CGGCAACTGC AACACCAAGT GCCAGACCCC TATGGGCGCC</p> <p>ATCAACAGCA GCATGCCTTT CCACAACATC CACCCTCTGA CCATCGGCGA</p> <p>GTGCCCTAAG TACGTGAAGA GCAACAGACT GGTGCTGGCC ACCGGCCTGA</p> <p>GAAACAGCCC TCAGAGAGAG AGAGGCTGT TCGGCGCCAT CGCCGGCTTC</p> <p>ATCGAGGGCG GCTGGCAGGG CATGGTGAC GGCTGGTACG GCTACCACCA</p> <p>CAGCAACGAG CAGGGCAGCG GCTACGCCG CGACAAGGAG AGCACCCAGA</p> <p>AGGCCATCGA CGGCGTGACC AACAGGTGA ACAGCATCAT CGACAAGATG</p>

Secuencia de aminoácidos de consenso de HA H5 mostrado en negrita: secuencia señal; y subrayado: secuencia de trimerización y etiqueta His.					
1201	AACACCCAGT	TCGAGGCCGT	GGGCAGAGAG	TTCAACAACC	TGGAGAGAAG
1251	AATCGAGAAC	CTGAACAAGA	AGATGGAGGA	CGGCTTCCTG	GACGTGTGGA
1301	CCTACAACGC	CGAGCTGCTG	GTGCTGATGG	AGAACGAGAG	AACCTGGAC
1351	TTCCACGACA	GCAACGTGAA	GAACCTGTAC	GACAAGGTGA	GACTGCAGCT
1401	GAGAGACAAC	GCCAAGGAGC	TGGGCAACGG	CTGCTTCGAG	TTCTACCACA
1451	AGTGCACAA	CGAGTGCATG	GAGAGCGTGA	GAAACGGCAC	CTACGACTAC
1501	CCTCAGTACA	GCGAGGAGGC	CAGACTGAAG	AGAGAGGAGA	TCAGCGGCGT
1551	GGATATCAGA	TCTCTGGTGC	CAAGAGGATC	TCCAGGATCT	GGATACATCC
1601	CAGAGGCTCC	AAGAGATGGA	CAAGCTTACG	TGAGAAAGGA	CGGAGAGTGG
1651	GTGCTGCTGT	CTACTTTCCT	GGGACACCAC	CACCACCACC	ACTAA
(SEQ ID NO: 5)					

La secuencia de consenso de H5 se utilizó para generar variantes glicosiladas de HA expresadas a partir de células humanas HEK293. Para generar una glicosilación de tipo de alto contenido en manosa (HA<sub>hm</sub>), se utilizaron células HEK293S, que son deficientes en N-acetilglucosaminiltransferasa I (GnTI). Con el fin de abordar el efecto de la glicosilación de HA en la afinidad y especificidad de unión al receptor, los azúcares en HA se separaron sistemáticamente de los N-glicanos de tipo complejo nativos (Fig. 1A). Los residuos de ácido siálico se separaron de HA<sub>fg</sub> mediante tratamiento con neuraminidasa (NA) para producir HA desialilada (HA<sub>ds</sub>). La endoglucosidasa H (Endo H) se utilizó para truncar todas las estructuras de glucano hacia un solo residuo de GlcNAc para producir HA monoglicosilada (HA<sub>mg</sub>). Por lo tanto, se generaron un total de cuatro glicofomas de HA: HA<sub>fg</sub>: HA completamente glicosilada de células HEK293E humanas; HA<sub>ds</sub>: HA desialilada del tratamiento con neuraminidasa (NA) de HA<sub>fg</sub>; HA<sub>hm</sub>: HA de alto contenido en manosa de células humanas deficientes en N-acetilglucosaminil transferasa I (GnTI) HEK293S, y HA<sub>mg</sub>: HA con un solo residuo de N-acetil glucosamina en sus sitios de glicosilación del tratamiento con Endoglucosidasa H (Endo H) de HA<sub>hm</sub> (Fig. 1A y Fig. 6). Las estructuras de glicano se verifican por análisis espectral de masas (Figs. 7, 8, 9). El dicroísmo circular de las variantes confirmó que sus estructuras secundarias son similares (Fig. 1C). Luego se estudió el único efecto de los N-glicanos sobre HA de diferentes glicofomas, asumiendo que las estructuras de proteínas 3D de estas muestras son similares y no provocan sesgo en el análisis (Fig. 1B). Se señala que un intento de expresar HA funcional en *Escherichia coli* fracasó debido a la falta de glicosilación.

Por otra parte, análisis por espectrometría de masas confirmaron que (a) HA<sub>fg</sub> contiene predominantemente el complejo de tipo N-glicano (Fig 7A.); (b) los ácidos siálicos han sido separados del complejo tipo N-glicanos en HA<sub>ds</sub> (Fig. 7B); (c) HA<sub>hm</sub> contiene predominantemente los N-glicanos de tipo de alto contenido en manosa (Fig. 7C); y (d) HA<sub>mg</sub> mostró solo una N-acetilglucosamina (GlcNAc) en HA (Fig. 1 y Fig. 8).

#### Perfil de micromatrices de glicanos de variantes glicosiladas de HA

El perfil de micromatrices de glicanos de las variantes glicosiladas de HA HA<sub>fg</sub>, HA<sub>ds</sub>, HA<sub>hm</sub> y HA<sub>mg</sub> se examinaron utilizando el método sándwich tradicional. La matriz de glicanos de ácido siálico sintético consistía en 17 de los  $\alpha$ 2,3 (glicanos 1-17) y 7 de los sialósidos  $\alpha$ 2,6 (glicanos 21-27) diseñados para explorar la especificidad para glicanos de los virus de la gripe (véase la Fig. 4). Los sialósidos sintéticos con un enlazador de cinco carbonos terminado con amina se prepararon y se unieron covalentemente sobre portaobjetos de vidrio recubiertos con NHS formando un enlace amida en condiciones acuosas a temperatura ambiente. El procedimiento de impresión se basó en la tecnología de impresión robótica de micromatrices estándar tal como se informó anteriormente (Blixt O, et al. (2004) Proc Natl Acad Sci USA 101:17033-17038; Wang CC, et al. (2008) Proc Natl Acad Sci USA 105:11661-11666). Se aplicaron variantes de HA a los portaobjetos del ácido siálico y luego se hibridaron con anticuerpo primario, seguido de detección con un anticuerpo secundario conjugado con Cy3. Este análisis indicó que la secuencia consenso de HA H5N1 se une específicamente a los sialósidos  $\alpha$ 2,3, pero no a los sialósidos  $\alpha$ 2,6 (Fig. 2A), de acuerdo con estudios previos (Chandrasekaran A, et al. (2008) Nat Biotechnol 26:107-113; Stevens J, et al. (2008) J Mol Biol 381:1382-1394). Sorprendentemente, la fuerza de unión con sialósidos  $\alpha$ 2,3 se hizo sucesivamente más fuerte de HA<sub>fg</sub>, HA<sub>ds</sub> y HA<sub>hm</sub> a HA<sub>mg</sub> (Fig. 2A) por unión cualitativa a través de la intensidad de fluorescencia relativa.

Las HA se pusieron en contacto con una matriz de glicanos sintéticos que contenía 17  $\alpha$ 2-3 (glicanos 1-17) y 7  $\alpha$ 2-6 (glicanos 21-27) sialósidos diseñados para el virus de la gripe (Fig. 4), y luego las proteínas HA se hibridaron con primaria no marcada, seguido de detección por anticuerpo secundario etiquetado con Cy3. El análisis indicó que la

hemaglutinina H5N1 de la gripe de la secuencia consenso puede unirse específicamente a los sialósidos  $\alpha$ 2-3 pero no a los sialósidos  $\alpha$ 2-6 (Fig. 2A). Sorprendentemente, la unión con los sialósidos  $\alpha$ 2-3 fue sucesivamente más fuerte de HA<sub>fg</sub>, HA<sub>ds</sub>, HA<sub>hm</sub> a HA<sub>mg</sub> (Fig. 2A) en la comparación de intensidad del perfil de la matriz de glicano.

Micromatrices de glicano cuantitativas

- 5 El perfil de la matriz de glicano se ha limitado a las naturalezas cualitativas en la investigación de eventos de unión, porque solo proporciona la intensidad de fluorescencia relativa, y los usuarios no pueden diferenciar la afinidad de unión a los receptores de los experimentos separados. Con el fin de determinar con precisión los eventos de unión, esta plataforma de micromatrices se extendió para determinar cuantitativamente las constantes de disociación de las interacciones HA-glicano.
- 10 Una matriz cuantitativa fue diseñada para determinar constantes de disociación de la superficie (Liang PH, et al. (2007) J Am Chem Soc 129:11177-11184). Para evitar cualquier sesgo por estratificación de anticuerpos, la HA se marcó directamente con el colorante fluorescente Cy3 (Srinivasan A, et al. (2008) Proc Natl Acad Sci USA 105:2800-2805). Los ensayos de unión directa se realizaron por dilución en serie de HAs marcadas con Cy3 para establecer las intensidades de unión relativas. Las constantes de disociación en la superficie se determinaron trazando las concentraciones de HA frente a la intensidad de fluorescencia para cada uno de los 24 sialósidos impresos en el portaobjetos de vidrio. Los valores de la constante de disociación  $K_{D,surf}$  se calcularon en base a las isothermas de Langmuir (véase la Fig. 2B). La unión monovalente de HA-sialósido es débil, exhibiendo constantes de disociación en el intervalo milimolar ( $K_D = 2,5 \times 10^{-3}$  M) (Sauter NK, et al. (1989) Biochemistry 28:8388-8396); sin embargo, la HA está implicada en interacciones multivalentes con sialósidos en la superficie de la célula huésped, lo que se puede ver en el perfil cuantitativo de la matriz (Tabla 2). Los valores de  $K_{D,surf}$  disminuyeron global y sustancialmente a medida que disminuyó la longitud de los N-glicanos en las HA (Fig. 2B).

Todas las glicofomas de HA mostraron una fuerte unión a glicanos receptores con un grupo sulfato en la posición 6 del tercer residuo GlcNAc desde el extremo no reductor (glicanos 4 y 7). Este grupo sulfato es importante para la unión a HA H5 (Chandrasekaran A, et al. (2008) Nat Biotechnol 26:107-113 ; Stevens J, et al. (2008) J Mol Biol 381:1382-1394). Además, se observó que el glicano 4 es el mejor ligando para HA<sub>fg</sub>, mientras que los glicanos 13-15 son mejores ligandos que el glicano 6 para HA<sub>mg</sub>, lo que indica una posible interacción multivalente dentro del sitio de unión al ligando, o la exposición de más dominios de unión a receptores a sialósidos biantenarios más grandes (glicanos 13 y 14). Curiosamente, la unión de HA aumenta sustancialmente a medida que sus estructuras de N-glicano se vuelven menos complejas (Fig. 2B). Sin embargo, aunque los valores de  $K_{D,surf}$  para HA<sub>mg</sub> muestran una unión más fuerte y similar a algunos glicanos de SA, las otras variantes de HA exhiben una unión más débil y más específica a los ligandos de glicano (Figs. 2B y 10). Por lo tanto, la especificidad de unión y la afinidad de unión pueden tener una relación inversa que está modulada por la estructura del glicano. Esta modulación puede tener una importancia biológica importante, ya que los hidratos de carbono en la HA pueden sintonizar su reconocimiento de los receptores de glicano en las células epiteliales del pulmón.

Contribución Energética de Unión de los Sialósidos Receptores

Los parámetros cinéticos se pueden aplicar a los parámetros termodinámicos para ilustrar los eventos de interacción en los detalles moleculares. La constante de disociación ( $K_{D,surf}$ ) de las interacciones HA-glicano puede utilizarse para calcular el cambio de unión de energía libre de Gibbs ( $\Delta G_{multi}$ ). Los valores para  $\Delta G_{multi}$  representan una medición cuantitativa de la energía estabilizadora de las interacciones de HA-glicano. Una disminución sucesiva en  $\Delta G_{multi}$  se correlaciona con la disminución sistemática en la complejidad/el truncamiento de las estructuras de N-glicano en HA (Tabla 2).

Tabla 2. Constantes de disociación ( $K_{D,surf}$ ) y cambios de energía libre ( $\Delta G$ ) de variantes glicosiladas de HA cuando se unen a los sialósidos  $\alpha$ 2,3 1-15

Sialósidos	$K_{D,surf}$ , $\mu M \pm DE$				ANOVA P *	$\Delta G$ , kcal/mol $\pm DE$			
	HA <sub>fg</sub>	HA <sub>fg</sub>	HA <sub>fg</sub>	HA <sub>fg</sub>		HA <sub>fg</sub>	HA <sub>fg</sub>	HA <sub>fg</sub>	HA <sub>fg</sub>
1	6,99 $\pm$ 0,41	2,86 $\pm$ 0,93	2,09 $\pm$ 0,59	0,27 $\pm$ 0,16	<0,0001	-7,03 $\pm$ 0,03	-7,58 $\pm$ 0,19	-7,76 $\pm$ 0,17	-8,80 $\pm$ 0,15
2	3,72 $\pm$ 1,01	2,47 $\pm$ 0,21	1,75 $\pm$ 0,32	0,20 $\pm$ 0,07	0,0002	-7,41 $\pm$ 0,16	-7,66 $\pm$ 0,06	-7,86 $\pm$ 0,11	-9,03 $\pm$ 0,07
3	4,55 $\pm$ 1,85	2,34 $\pm$ 0,27	0,92 $\pm$ 0,16	0,26 $\pm$ 0,06	0,0002	-7,31 $\pm$ 0,25	-7,68 $\pm$ 0,07	-8,24 $\pm$ 0,10	-8,90 $\pm$ 0,01

Sialósidos	K <sub>D, surf</sub> , μM ± DE				ANOVA P *	ΔG, kcal/mol ± DE			
	HA <sub>fg</sub>	HA <sub>fg</sub>	HA <sub>fg</sub>	HA <sub>fg</sub>		HA <sub>fg</sub>	HA <sub>fg</sub>	HA <sub>fg</sub>	HA <sub>fg</sub>
4 4	0,27 ± 0,01	0,27 ± 0,05	0,33 ± 0,09	0,13 ± 0,06	0,0048	-8,96 ± 0,03	-8,95 ± 0,10	-8,84 ± 0,16	-9,45 ± 0,27
5 5	ND	5,20 ± 1,01	9,40 ± 3,20	0,54 ± 0,15	ND	ND	-7,21 ± 0,11	-6,88 ± 0,21	-8,49 ± 0,13
6 6	20,03 ± 4,24	9,22 ± 2,05	2,71 ± 0,53	0,80 ± 0,05	<0,0001	-6,41 ± 0,13	-6,87 ± 0,13	-7,65 ± 0,06	-8,32 ± 0,05
7 7	0,57 ± 0,10	0,77 ± 0,08	0,61 ± 0,02	0,32 ± 0,10	0,0010	-8,46 ± 0,06	-8,36 ± 0,04	-8,47 ± 0,02	-8,78 ± 0,14
8	2,49 ± 0,58	2,48 ± 0,41	1,69 ± 0,53	0,36 ± 0,13	0,0008	-7,65 ± 0,14	-7,65 ± 0,10	-7,89 ± 0,21	-8,82 ± 0,30
9 9	ND	15,34 ± 5,06	4,40 ± 0,56	0,86 ± 0,34	ND	ND	-6,58 ± 0,20	-7,31 ± 0,08	-8,18 ± 0,16
10	7,64 ± 2,3	3,61 ± 0,61	1,22 ± 0,52	0,29 ± 0,14	0,0003	-6,99 ± 0,18	-7,43 ± 0,10	-8,09 ± 0,24	-8,77 ± 0,03
11	6,02 ± 1,04	2,32 ± 0,14	1,11 ± 0,51	0,33 ± 0,08	<0,0001	-7,12 ± 0,10	-7,68 ± 0,04	-8,15 ± 0,25	-8,91 ± 0,18
12	40,23 ± 9,77	ND	2,45 ± 0,52	1,41 ± 0,92	ND	-6,00 ± 0,15	ND	-7,66 ± 0,12	-7,85 ± 0,25
13	3,38 ± 1,06	1,37 ± 0,30	0,31 ± 0,06	0,07 ± 0,01	0,0008	-7,47 ± 0,19	-8,05 ± 0,13	-8,88 ± 0,13	-9,77 ± 0,09
14	2,72 ± 0,41	0,97 ± 0,41	0,42 ± 0,03	0,09 ± 0,01	<0,0001	-7,59 ± 0,09	-8,27 ± 0,28	-8,69 ± 0,04	-9,60 ± 0,01
15	2,37 ± 0,19	1,32 ± 0,16	0,89 ± 0,35	0,09 ± 0,01	0,0002	-7,67 ± 0,05	-8,02 ± 0,07	-8,29 ± 0,27	-9,62 ± 0,08

La Tabla 2 muestra los parámetros termodinámicos de HA con diferentes glicosilaciones en respuesta a los sialósidos α2,3 1-15. Los cambios de energía libre (ΔG) y K<sub>D, surf</sub> de interacciones HA-glicano se muestran en respuesta a los sialósidos α2,3 1-15. Los valores de ΔG pueden derivarse de los valores de K<sub>D, surf</sub> utilizando la ecuación  $\Delta G_{\text{multi}} = -RT \ln(K_{D, \text{surf}}^{-1})$ . Los valores de ΔG se calcularon de acuerdo con los valores de K<sub>D, surf</sub> para obtener cambios de energía libre en la unión de HA-glicano. ΔG (HA<sub>fg</sub>) de los glicanos 5 y 9 no está determinado. ND indica no determinado. (\*Del conjunto de 15 sialósidos de unión a HA identificados, se muestran diferencias estadísticamente significativas de los valores de K<sub>D, surf</sub> entre cuatro glicoformas de HA, utilizando un ANOVA unidireccional (P <0,05 se considera significativo)).

- 10 Las diferencias en el cambio de energía libre (ΔΔG) entre las variantes de HA son provocadas por estructuras de glicano únicas (Figura 10), y la diferencia más grande es entre HA<sub>fg</sub> y HA<sub>mg</sub> (ΔΔG HA<sub>fg</sub> → HA<sub>mg</sub>; véase la Figura 10), que es consistente con la mayor diferencia en la energía de unión resultante del corte de la mayor parte del N-glicano a una sola GlcNAc. Se señala que los valores de ΔΔG son similares, excepto para los glicanos 4 y 7 (Figura 10), lo que indica que los glicanos en HA no afectan significativamente a la afinidad de unión con el trisacárido α2,3 sulfatado (Chandrasekaran A, et al. (2008) Nat Biotechnol 26:107-113).

#### Unión HA-receptor

- 20 Los detalles moleculares de la unión HA-receptor (es decir, la contribución de cada uno de los componentes estructurales que comprende un receptor de glicano) pueden abordarse mediante la comparación de las diferencias en el cambio de energía libre (valores ΔΔG) entre diferentes sialósidos del receptor (Figs. 4 y 11). La disección de la contribución de energía de los sialósidos receptores responsables de la unión a HA revela puntos clave de especificidad que se utilizan para diseñar nuevos inhibidores de HA. Los sialósidos α2,3 enlazados a residuos de galactosa con enlaces β1,4 (Galβ1-4) poseen una mejor afinidad de unión que aquellos con enlaces Galβ1-3 (Stevens J, et al. (2008) J Mol Biol 381:1382-1394). Esto se refleja en la comparación de la cadena principal de disacárido Neu5Ac-α2,3-galactosa (Neu5Acα2,3Gal) (Fig. 4A, glicano 1, resaltado de recuadro rojo), en que los trisacáridos 3 y 6 solo difieren en el enlace entre Gal y GlcNAc. Aquí, el ΔΔG (1 → 3) para todas las variantes de HA

es negativo (interacción estabilizadora de HA-receptor), mientras que el  $\Delta\Delta G$  (1  $\rightarrow$  6) para todas las variantes de HA es positivo (interacción desestabilizadora de HA-receptor; Figs. 4A y 11). Esta observación indica que Neu5Ac- $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1-4Glc/GlcNAc es el componente central de glucano que interactúa con el bolsillo de unión a HA. Además, el valor de  $\Delta\Delta G$  (1  $\rightarrow$  9) para todas las variantes de HA es positivo, lo que indica una perturbación negativa provocada por la manosa enlazada a  $\beta$ 6 en la tercera posición (Figs. 4A y 11). Por lo tanto, la energía de unión se ve afectada por los residuos de azúcar internos y sus patrones de enlace con el ligando disacárido Neu5Ac- $\alpha$ 2,3Gal distal (Fig. 4A). Este análisis demuestra que un residuo GlcNAc en la tercera posición es favorecido para todas las variantes de HA. Sin embargo, al comparar los valores de  $\Delta\Delta G$  para los glicanos 13 y 14 (Figs. 4E y 11) con el glicano 6, las interacciones multivalentes en el sitio de unión con el sialósido biantenarico son evidentes, y para HA<sub>mg</sub>, esta avidéz intramolecular es más significativa para impulsar la unión que el efecto estructural ejercido por el tercer azúcar.

A continuación, se compararon los glicanos del receptor 10, 11, 12, y 15. Estos tienen la misma estructura básica del núcleo (trisacárido de glicano 8), pero difieren en la elongación (glicanos 11 y 12) o en la adición de un ácido siálico  $\alpha$ 2,6 en la tercera posición (glicano 15; Fig. 4B). Es interesante que el sialósido con el ácido siálico  $\alpha$ 2,6 ramificado aumentara en gran medida la avidéz por la HA, mientras que el sialósido  $\alpha$ 2,3 más largo que se extiende desde el glicano 8 resultó en una unión más débil por las HAa ( $\Delta\Delta G$  (8  $\rightarrow$  15) >  $\Delta\Delta G$  (8  $\rightarrow$  11)  $\sim$   $\Delta\Delta G$  (8  $\rightarrow$  10) >  $\Delta\Delta G$  (8  $\rightarrow$  12); Fig. 4B y 11).

Los glicanos 3-5 y 6-7 comparten la misma cadena principal de trisacárido, pero difieren por la adición de un grupo sulfato (glicano 4) o un residuo fucosa (glicano 5) en la tercera GlcNAc desde el extremo no reductor. El grupo sulfato puede estabilizar la interacción de glicano del receptor HA hasta 2.044 kcal/mol ( $\Delta\Delta G$  (6  $\rightarrow$  7)), la mayor brecha de energía entre dos sialósidos receptores. Entre todas las variantes de HA, la variante completamente glicosilada mostró las diferencias más significativas en los cambios de energía libre, con valores de  $\Delta\Delta G$  (3  $\rightarrow$  4) HA<sub>fg</sub> (-1,653 kcal/mol) y  $\Delta\Delta G$  (6  $\rightarrow$  7) HA<sub>fg</sub> (-2,044 kcal/mol), y el tamaño de la ganancia de energía libre disminuyó a medida que se simplificó la estructura del glicano; es decir, HA<sub>fg</sub> > HA<sub>ds</sub> > HA<sub>hm</sub> > HA<sub>mg</sub>. Por lo tanto, los glicanos sulfatados potencian drásticamente la unión a HA, y la HA totalmente glicosilada maximiza este efecto (Figs. 4C y D), lo cual es importante para la patogénesis de H5N1. Por otro lado, los análogos de receptores fucosilados desestabilizan en gran medida la unión de HA, con todas las variantes de HA glicosiladas que muestran un  $\Delta\Delta G$  positivo (3  $\rightarrow$  5) (Fig. 4C). Estas grandes diferencias en  $\Delta\Delta G$  (3  $\rightarrow$  4) y  $\Delta\Delta G$  (3  $\rightarrow$  5) son probablemente provocadas por una interacción de unión importante en el bolsillo de unión al receptor, que el grupo sulfato maximiza y la fucosa bloquea estéricamente. La unión débil de HA<sub>fg</sub> es improbable debido a la competencia de sus sialilglicanos, porque la separación del ácido siálico tiene un pequeño efecto sobre la unión, y HA<sub>fg</sub> aún exhibe una fuerte afinidad por ciertos sialilglicanos específicos.

#### Diseño de Vacunas Utilizando HA Monoglicosilada

La hemaglutinina monoglicosilada HA<sub>mg</sub> muestra una estructura secundaria similar y mejor afinidad de unión a los receptores del huésped en comparación con su homólogo totalmente glicosilado. Estudios recientes también indicaron que un solo residuo de GlcNAc para Asn es el componente mínimo del N-glicano requerido para el plegamiento y la estabilización de la glicoproteína (Hanson SR, et al. (2009) Proc Natl Acad Sci USA 106:3131-3136). Debido a que las proteínas son inmunógenos superiores a los glicanos, la HA monoglicosilada se testó como una vacuna proteica contra virus de la gripe. Los antisueros de las inmunizaciones HA<sub>fg</sub> y HA<sub>mg</sub> se compararon con respecto a su capacidad de unirse a HA nativas y neutralizar los virus H5 (Fig. 5). De hecho, en contraste con HA<sub>fg</sub>, el antisuero de HA<sub>mg</sub> mostró una mayor neutralización del virus. El antisuero HA<sub>mg</sub> también se une a H1 (New Caledonia/1999) además de los subtipos H5 Vietnam/1194, H5 (Anhui) y H5 (ID5/2005) (Fig. 5D). En particular, la vacuna HA<sub>mg</sub> fue mucho más protectora que la vacuna HA<sub>fg</sub> en un estudio de enfrentamiento (Fig. 5C).

Las secuencias de aminoácidos de H1, H3, H5 aisladas de seres humanos se compararon en Fig. 3. Al comparar H1 con H3 y H3 con H5, se observan diferencias en las secuencias de aminoácidos totales, así como las que están cerca de los sitios de N-glicosilación. H1 y H5 muestran similitudes de secuencia de aminoácidos globales más altas, y las secuencias cercanas a los sitios de N-glicosilación están más conservadas. Las cepas H1 estacionales (A/Brisbane/59/2007) y pandémicas (A/California/07/2009) muestran aproximadamente un 79% de identidad de secuencia. La identidad global de la secuencia fue de aproximadamente 63% entre H1 y H5, y de aproximadamente 40% entre H3 y H5, y H1 y H3. Además, los sitios de N-glicosilación (mostrados dentro de los cuadros rojos en la Fig. 3) y las secuencias de péptidos subyacentes están más conservadas entre H1 y H5 que entre H1 / H3 y H5.

La presente invención demuestra que la simplificación sistemática de N-glicanos en HA resulta en un aumento sucesivo en la unión a sialósidos  $\alpha$ 2,3 pero no a sialósidos  $\alpha$ 2,6. Los autores de la invención, por primera vez, muestran el efecto de los glicanos externos e internos de HA sobre la unión del receptor y diseccionan cuantitativamente la afinidad de unión y las contribuciones energéticas de las interacciones receptor-HA.

La glicosilación de HA afecta la función de la gripe HA (Wagner R, et al. (2002) J Gen Virol 83:601-609). Curiosamente, a medida que el nivel de glicosilación en la gripe H3N2 ha aumentado desde 1968, la morbilidad, la mortalidad y los títulos virales de los pulmones han disminuido (Vigerust DJ, et al. (2007) J Virol 81:8593-8600).

5 Sin desear estar ligado por la teoría, el hallazgo de que HA con una sola GlcNAc unida a los sitios de glicosilación muestra especificidad relajada pero afinidad mejorada a sialósidos  $\alpha$ 2,3 sugiere que los N-glicanos en HA pueden provocar un impedimento estérico cerca del dominio de unión HA-receptor. La alta especificidad para los sialósidos receptores puede evitar que el virus se una a otros glicanos específicos en la superficie de la célula epitelial del pulmón humano. Por otro lado, la AH con glicanos truncados puede reconocer los sialósidos  $\alpha$ 2,3 del receptor con mayor afinidad de unión y menos especificidad, lo que sugiere que la reducción de la longitud de los glicanos en la HA puede aumentar el riesgo de infección por gripe aviaria. Sin embargo, no está claro cómo los cambios en la interacción HA-receptor a través de la glicosilación afectan a la infectividad del virus y a la actividad de NA en el ciclo de vida viral.

15 La HA con una GlcNAc única es un candidato prometedor para la vacuna contra la gripe, porque dicha construcción retiene la estructura intacta de la HA y puede prepararse fácilmente (p. ej., a través de la levadura). También puede exponer epítomos conservados ocultos por glicanos grandes para provocar una respuesta inmune que reconoce las variantes de HA en un título más alto. Esta estrategia abre una nueva dirección para el diseño de la vacuna y, junto con otras estrategias de vacuna diferentes (Hoffmann E, et al. (2005) Proc Natl Acad Sci USA 102:12915-12920; Huleatt JW, et al. (2008) Vaccine 26:201-214; Scanlan CN, et al. (2007) J Mol Biol 372:16-22; Yang ZY, et al. (2007) Science 317:825-828) y descubrimientos recientes de anticuerpos neutralizantes de HA (Ekiert DC, et al. (2009) Science 324:246-251; Kashyap AK, et al. (2008) Proc Natl Acad Sci USA 105:5986-5991; Scheid JF, et al. (2009) Nature 458:636-640; Stevens J, et al. (2006) Science 312:404-410; Sui JH, et al. (2009) Nat Struct Mol Biol 16:265-273), deberían facilitar el desarrollo de vacunas contra virus, tales como la gripe, el virus de la hepatitis C y VIH.

25 Por lo tanto, se testó si HA con una sola GlcNAc puede ser un candidato prometedor para la vacuna contra la gripe. Para los beneficios de su fuerte unión con 0,2-3 sialósidos, HA con una GlcNAc única puede provocar una respuesta inmune que reconoce la región cercana a RBD con títulos más altos, lo que indica que la adición de oligosacáridos puede ser un medio eficaz de evasión inmune a través de la modificación o el enmascaramiento de epítomos antigénicos en el virus. Por lo tanto, la estrategia de separación de la mayoría de los glicanos, pero con al menos una retención de GluNAc, abre una nueva dirección para el diseño futuro de la vacuna, y este concepto proporciona información sobre otros diseños de vacunas antivirales tales como el VHC, el VHB y el VIH. Otras iteraciones tienen dos, tres o más glicanos de la cadena de glicano original restante.

#### Glicoproteínas de la superficie celular parcialmente glicosiladas como vacunas

35 Las glicoproteínas de la superficie celular de los virus son buenas dianas para el desarrollo de vacunas. Sin embargo, proteínas de la superficie de este tipo son a menudo altamente glicosiladas por el huésped para proteger al virus del sistema inmunitario del huésped. Además, las secuencias de proteínas virales alrededor de los sitios de glicosilación están a menudo altamente conservadas y, por lo tanto, son un buen antígeno para el diseño de la vacuna, sin embargo, estas regiones altamente conservadas no están fácilmente disponibles para el sistema inmunitario del huésped, al menos en parte, debido a la cantidad de glicosilación que cubre o bloquea esas regiones. Por ejemplo, una razón del éxito limitado en la preparación de vacunas contra el VIH intacto es porque la superficie viral gp120 está altamente glicosilada.

40 La nueva vacuna es más inmunogénica y se espera que el anticuerpo inducido tenga una mejor actividad de neutralización contra la glicoproteína intacta, que se hace por el virus y el huésped. El anticuerpo es capaz de atacar tanto la región o regiones menos o no glicosiladas que tienen más probabilidades de mutar, y la región glicosilada que está altamente conservada es menos probable que mute y/o sea sensible a la mutación. Un anticuerpo generado de este modo interactuará fuertemente con la parte de proteína de la diana, ya que dicho anticuerpo tiene mayor afinidad por la proteína que el hidrato de carbono y, por lo tanto, termodinámicamente separará la cadena de glicano para unir las regiones altamente conservadas alrededor de los sitios de glicosilación.

50 En las glicoproteínas O- y N-enlazadas el primer azúcar (N-acetilglucosamina para N-glicoproteína y N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina para O-glicoproteínas) es esencial para preservar la estructura terciaria de la glicoproteína, mientras que el resto de los azúcares no son importantes. El tratamiento de las N-glicoproteínas con la endoglicosidasa (endoH) separará la cadena de azúcar y mantendrá la N-acetil glucosamina unida a la proteína. Las manosidasas también se pueden utilizar para escindir las N-glicoproteínas en di o tri-glicanos, que se contemplan expresamente aquí como posibles vacunas debido a la capacidad del sistema inmunitario de acceder a los sitios de glicosilación conservados en las proteínas incluso con di, tri y proteínas desglucosiladas más grandes. Otras glicosidasas también están disponibles para separar la cadena de azúcar de las O-glicoproteínas y mantener el primer azúcar unido a la proteína.

55

5 Cuando una hemaglutinina (HA) completamente glicosilada de la gripe aviar (H5) expresada en células humanas se trata con EndoH para reducir la glicosilación a un estado monoglicosilado y se utiliza en la inmunización de conejo, el antisuero generado tiene un título más alto que el antisuero generado a partir de la hemaglutinina completamente glicosilada. (Figs. 13A-13B). También es capaz de neutralizar la hemaglutinina de otras cepas de gripe aviar y la hemaglutinina H1 de la gripe humana, mientras que el antisuero de la HA totalmente glicosilada no puede neutralizar H1 y es más específico para la cepa de gripe aviar.

10 La similitud del patrón de glicosilación y la estructura de la proteína entre H1 y H5 proporciona una posible razón por qué el antisuero de H5 mono-glicosilado reacciona de forma cruzada con H1. Los datos se obtuvieron utilizando antisueros de conejo. (Fig. 13). Como se muestra en las Figs. 12-14, la hemaglutinina de H3 no tiene el mismo grado de homología que HA H5 con HA H1. Por lo tanto, el antisuero generado a partir de H1 y H5 no neutraliza H3. Sin embargo, debido a que H3 comparte otra homología en las regiones conservadas con H1 y H5, el antisuero generado a partir de hemaglutinina H3 desglicosilada neutraliza la hemaglutinina H1 y la hemaglutinina H5 además de la hemaglutinina H3.

15 Para preparar la hemaglutinina monoglicosilada no es necesario hacer que la glicoproteína del cultivo de células humanas, tal como la glicoproteína con los primeros tres azúcares (Manosa-N-acetilglucosamina-N-acetilglucosamina) o solo el monosacárido (N-acetilglucosamina) unido a la proteína (es decir, la proteína N-acetilglucosamina) está altamente conservada en eucariotas. Por lo tanto, se puede producir la glicoproteína en levaduras, baculovirus u otros huéspedes eucariotas y tratar la mezcla de glicoproteínas con la glicosidasa apropiada, tal como endoH o manosidasa para las glicoproteínas unidas a N, para preparar la proteína monoglicosilada homogénea para usar como vacuna.

20 Sin desear estar ligado por la teoría, se postula que el glicano enlazado a N es mucho más largo que el glicano enlazado a O y es el glicano enlazado a N el que necesita ser cortado para separar el resto de las cadenas de azúcar. Por lo tanto, el glicano enlazado a O no provocará un problema incluso si está intacto.

25 Una glicoproteína nativa que se expone al sistema inmune tiene una glicoproteína ramificada enlazada a N. Debido a la glicosilación, la región altamente conservada es inaccesible para el sistema inmunitario. Por lo tanto, el sistema inmunitario solo puede fijar como objetivo regiones altamente variables, reduciendo así al sujeto susceptible a múltiples infecciones virales a medida que las regiones variables mutan. Si el sistema inmunitario es capaz de acceder a las regiones altamente conservadas, entonces los anticuerpos dirigidos a estas secuencias que no varían con el tiempo proporcionan una ruta hacia la inoculación contra virus que tienen regiones variables que mutan y, por lo tanto, hacen que los anticuerpos existentes contra las glicoproteínas sean ineficaces de manera tan glicosilada que sea sustancialmente inaccesible para el sistema inmunitario.

30 Por lo tanto, para hacer que la proteína sea accesible al sistema inmunitario a través de una vacuna, se elimina la glicosilación, exponiendo así la proteína viral nativa al sistema inmunitario. Es importante destacar que la separación completa de los azúcares de la proteína ha demostrado que provoca que la proteína se desnaturalice; en muchas glicoproteínas virales, la glicosilación es un componente clave para la estructura terciaria de la glicoproteína.

35 Los azúcares son separados mediante la exposición de las proteínas glicosiladas nativas aisladas a una N-glicosidasa, por ejemplo endoH o manosidasa, que escindirán a todos, a excepción del primero, dos o tres azúcares de la glicoproteína, sin provocar que la proteína se pierda su estructura terciaria. Las proteínas desglicosiladas se formulan luego con un soporte farmacéutico adecuado como una vacuna y se administran a un sujeto. Debido a que las regiones de glicosilación altamente conservadas están ahora desglicosiladas y, por lo tanto, están expuestas al sistema inmunitario, se generan anticuerpos contra las regiones altamente conservadas.

40 Cuando los sujetos inmunizados se infectan con el virus y las glicoproteínas virales se exponen al sistema inmunitario, los anticuerpos que se dirigen a las regiones altamente conservadas de la proteína están presentes en el sistema del sujeto. Por lo tanto, la mutación en regiones variables se vuelve irrelevante, porque todavía hay anticuerpos dirigidos a las regiones conservadas no mutantes de la glicoproteína.

45 Por otra parte, la glicosilación no impide la unión de los anticuerpos a las regiones altamente conservadas, porque los anticuerpos están inclinados termodinámicamente a unirse a la proteína y "empujan" a los azúcares fuera del camino para la unión de los anticuerpos a las regiones altamente conservadas. Es importante destacar que en proteínas virales, tales como la gp120 del VIH, esta estrategia proporciona un método y una composición para la inoculación en los que el sistema inmunitario no produciría de otro modo un título de anticuerpos lo suficientemente grande como para combatir eficazmente la infección.

50 De acuerdo con implementaciones que incorporan estos principios, se contempla una vacuna que comprende al menos una hemaglutinina desglicosilada y un soporte farmacéuticamente aceptable. La vacuna se puede hacer

utilizando cualquier sistema que exprese proteínas glicosiladas, tales como levadura y baculovirus. Una vez que se preparan las proteínas, se aíslan utilizando un método adecuado, tal como electroforesis en gel, cromatografía u otros métodos capaces de aislar proteínas.

5 El patrón de glicosilación en el sitio de glicosilación se conserva en casi todos los eucariotas (GlcNAc-GlcNAc-Man). Por lo tanto, no importa cuál sea el patrón de glicosilación aguas abajo, siempre que permanezcan los primeros azúcares 1-3 (potencialmente dependiendo más del organismo que se inocula y del organismo que produce la proteína). Por lo tanto, para una vacuna humana, la levadura se puede utilizar para producir la proteína utilizada en una vacuna humana, porque una vez que se escinden todos menos uno a tres azúcares, el patrón es idéntico al primero a tres azúcares en la versión humana de la glicoproteína. Por lo tanto, la presente divulgación proporciona una plataforma única para la producción de vacunas de alto rendimiento y alta producción contra virus, tales como la gripe, VIH y flavivirus.

15 Para generar las vacunas, las proteínas glicosiladas se aíslan y luego se desglicosilan (parcialmente) utilizando una glicosidasa, u otra enzima o método que digiere selectivamente los hidratos de carbono que forman la glicosilación. Sin embargo, cualquiera que sea el método utilizado para escindir las cadenas de azúcar, no debe afectar a la estructura terciaria de la proteína subyacente.

20 Las glicoproteínas parcialmente glicosiladas, o fragmentos de las mismas, también se pueden preparar sintéticamente. Hay dos estrategias para la síntesis de glicopéptidos. (i) Método por etapas: los glicosilaminoácidos se utilizan como un bloque de construcción para la síntesis en fase sólida. La ventaja de este enfoque es el "uso amplio" para la preparación de diversos glicopéptidos. Este enfoque permite la preparación de glicopéptidos que tienen algunos restos oligosacáridos. (ii) Método convergente: un resto oligosacárido y un resto péptido se preparan por separado y luego se acoplan entre sí. Comúnmente, este enfoque se utiliza para la preparación de N-glicopéptidos. Este enfoque requiere un grupo protector ortogonal especial de cadena lateral para el "punto de glicosilación" en el resto péptido.

25 En una realización, N-acetilglucosamina (GlcNAc) unida al residuo asparagina del péptido puede sintetizarse utilizando un método de tioéster para construir el segmento de polipéptido (Merrifield RB J. Am Chem Soc. 85: 2149 (1983)) y un método de anhídrido dimetilfosfinitoico mixto (Mpt-MA) para la incorporación del resto glicopéptido (Guo, ZW, et al. (1997) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 36, 1464-1466).

#### Vacunas contra la Gripe de reacción cruzada generadas a partir de proteínas HA monoglicosiladas

A) Vacunación con la proteína HA estacional H1 (Brisbane) monoglicosilada.

30 Se utilizó un ensayo de inhibición de la hemaglutinación para detectar si antisueros de vacunación con H1 (Brisbane) pueden inhibir la capacidad del virus NIBRG-121 (cepa de vacuna Pandemic 2009 A(H1N1)) de aglutinar glóbulos rojos. Como se muestra en la Figura 15A, los antisueros de la vacunación con HA monoglicosilada (HA<sub>mg</sub>) de H1 (Brisbane) demostraron una mejor capacidad para inhibir la capacidad del virus NIBRG-121 (H1N1/2009) de aglutinar los glóbulos rojos que la HA (HA<sub>tg</sub>) totalmente glicosilada y HA no glicosilada (HA<sub>ug</sub>).

35 Se utilizó un ensayo de micro neutralización para detectar si los antisueros de la vacunación con H1 (Brisbane) pueden neutralizar la capacidad del virus NIBRG-121 (cepa de vacuna Pandemic 2009 A(H1N1)) de infectar células MDCK. Tal como se muestra en la Figura 15B, la HA monoglicosilada (HA<sub>mg</sub>) de H1 (Brisbane) demostró una mejor capacidad de neutralizar la capacidad del virus NIBRG-121 (H1N1/2009) de infectar células MDCK que la HA totalmente glicosilada (HA<sub>tg</sub>) y la HA no glicosilada (HA<sub>ug</sub>).

40 Se realizó un experimento de enfrentamiento al virus para demostrar que la vacunación con HA monoglicosilada de H1 (Brisbane) puede proteger el enfrentamiento al virus NIBRG-121 (cepa de vacuna Pandemic 2009 A(H1N1)). Tal como se muestra en la Figura 15C, la HA monoglicosilada (Brisbane) como una vacuna protege a los ratones BALB/c del enfrentamiento al virus NIBRG-121 (cepa de vacuna Pandemic 2009 A(H1N1)). Por el contrario, la HA totalmente glicosilada, que está presente en las vacunas tradicionales contra la gripe hechas a partir de virus inactivados, no revela capacidad de protección cruzada contra la infección por el virus H1N1 (cepa de vacuna Pandemic 2009 A (H1N1)).

50 Las Figs. 16A-16C muestran la inhibición de WSN (H1N1) 1933 por antisueros generados utilizando HA monoglicosilada H1 (Brisbane) como antígeno. La Fig. 16A muestra la inhibición de la capacidad del virus WSN (H1N1) 1933 de aglutinar glóbulos rojos. La Fig. 16B muestra la inhibición de la capacidad del virus WSN (H1N1) 1933 de infectar células MDCK. La Figura 16C muestra la protección de ratones BALB/c contra la infección por el virus de la gripe WSN (H1N1) 1933. El antisuero utilizado fue ratones inmunizados con proteínas HA de Brisbane (5 µg) y el virus utilizado para la exposición fue WSN (H1N1) 1933 (100 x DL<sub>50</sub>).

5 Tal como se muestra en la Figura 16A, los antisueros de la vacunación con HA monoglicosilada (HA<sub>mg</sub>) de H1 (Brisbane) demostraron una mejor capacidad de inhibir la capacidad del virus WSN (H1N1) 1933 para aglutinar glóbulos rojos que la HA totalmente glicosilada (HA<sub>tg</sub>) y HA no glicosilada (HA<sub>ug</sub>). Tal como se muestra en la Figura 16B, la HA monoglicosilada (HA<sub>mg</sub>) de H1 (Brisbane) demostró una mejor capacidad de neutralizar la capacidad del virus WSN (H1N1) 1933 de infectar células MDCK que la HA totalmente glicosilada (HA<sub>tg</sub>) y la HA no glicosilada (HA<sub>ug</sub>). Tal como se muestra en la Figura 16C, la HA monoglicosilada (Brisbane) como vacuna protege a los ratones BALB/c del enfrentamiento al virus WSN (H1N1) 1933. Por el contrario, la HA completamente glicosilada, que está presente en las vacunas tradicionales contra la gripe hechas a partir de virus inactivados, no revela capacidad de protección cruzada contra la infección por el virus WSN (H1N1) 1933.

10 Las Figs. 17A-17C muestran la inhibición de A/Puerto Rico/8/34 (H1N1): PR8 por parte de antisueros generados utilizando HA monoglicosilada de H1 (Brisbane) como antígeno. La Fig. 17A muestra la inhibición de la capacidad del virus PR8 para aglutinar glóbulos rojos. La Fig. 17B muestra la inhibición de la capacidad del virus PR8 de infectar células MDCK. La Figura 17C muestra la protección de ratones BALB/c contra la infección por el virus de la gripe PR8. El antisuero utilizado fue ratones inmunizados con proteínas HA de Brisbane (5 µg) y el virus utilizado para la exposición fue PR8 (100 x DL<sub>50</sub>).

20 Tal como se muestra en la Figura 17A, los antisueros de la vacunación con HA monoglicosilada (HA<sub>mg</sub>) de H1 (Brisbane) demostraron una mejor capacidad para inhibir la capacidad del virus PR8 para aglutinar glóbulos rojos que HA totalmente glicosilada (HA<sub>tg</sub>) y HA no glicosilada (HA<sub>ug</sub>). Tal como se muestra en la Figura 17B, la HA monoglicosilada (HA<sub>mg</sub>) de H1 (Brisbane) demostró una mejor capacidad de neutralizar la capacidad del virus PR8 para infectar células MDCK que la HA totalmente glicosilada (HA<sub>tg</sub>) y la HA no glicosilada (HA<sub>ug</sub>). Tal como se muestra en la Figura 17C, la HA monoglicosilada (Brisbane) como vacuna protege a ratones BALB/c del enfrentamiento al virus PR8. Por el contrario, la HA totalmente glicosilada, que está presente en las vacunas tradicionales contra la gripe hechas a partir de virus inactivados, no revela capacidad de protección cruzada contra la infección por el virus PR8.

25 (B) Vacunación con la nueva proteína HA monoglicosilada de H1 (cepa de vacuna Pandemic 2009 A (H1N1))

30 La secuencia codificante de HA de la gripe H1 (cepa de vacuna Pandemic 2009 A(H1N1)) se aisló y se modificó para la expresión tal como se describe en el Ejemplo 1. La Tabla 3 muestra la secuencia de la modificación de la cepa de la vacuna Pandemic 2009 A(H1N1) H1/HAdel-TM-FH6, en que la secuencia del péptido señal está subrayada y en negrita, el sitio de escisión de la trombina está en cursiva, la secuencia de trimerización de foldon de la fibrina del bacteriófago T4 y la etiqueta His está subrayada, y la secuencia del enlazador está en negrita y subrayada.

35 Tabla 3. Secuencia de hemaglutinina de la gripe H1 (cepa de vacuna Pandemic 2009 A(H1N1))

Secuencia de aminoácidos de la cepa de vacuna contra la gripe Pandemic 2009 A(H1N1) HA del-TM-FH6	
<b><u>MKAILVLLYTFATANADTLCI</u></b> GYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLL	50
EDKHNGKLCCKLRGVAPLHLGKCNIAAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETP	100
SSDNGTCYPGDFIDYEELREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVT	150
AACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNYPKLSKSYINDKGKEVLVLWGIHHP	200
TSADQQSLYQNADAYVFGSSRYSKFKPEIAIRPKVRDQEGRMNYYWTL	250
VEPGDKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDCNTTCQTPK	300
GAINSTSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNIPSIQSRGLFGAI	350
AGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVI	400
EKMNTQFTAVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENER	450
TLDYHDSNVKNLYEKVRSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGT	500
YDYPKYSEEAKLNREEIDGV <b><u>DIRS</u></b> <b><u>LVPRGSPGSGYIPEAPRDGOAYVRKD</u></b>	550
<b><u>GEVLLSTFLGHHHHH</u></b>	
(SEQ ID NO: 6)	

Secuencia de nucleótidos de la cepa de vacuna contra la gripe Pandemic 2009 A(H1N1) HA del-TM-FH6

```

1 ATGGCGCGCC GCTAGCATGA AGGCCATCCT GGTGTGCTG CTGTACACCT
51 TCGCTACCGC CAACGCCGAT ACCCTGTGCA TCGGCTACCA CGCCAACAAC
101 AGCACCGACA CCGTGGATAC CGTGCTGGAA AAGAACGTGA CCGTGACCCA
151 CAGCGTGAAC CTGCTGGAAG ATAAGCACAA CGGCAAGCTG TGCAAGCTGA
201 GAGGCGTGGC CCCTCTGCAC CTGGGCAAGT GCAATATCGC CGGCTGGATC

251 CTGGGCAACC CCGAGTGCGA GAGCCTGAGC ACCGCCAGCA GCTGGTCCTA
301 CATCGTGGAG ACACCCAGCA GCGACAATGG CACCTGTTAC CCCGGCGACT
351 TCATCGACTA CGAGGAACTG CGGGAGCAGC TGAGCAGCGT GTCCAGCTTC
401 GAGCGGTTTC AGATCTTCCC CAAGACCAGC TCTTGCCCA ACCACGACAG
451 CAACAAGGGC GTGACCGCCG CCTGTCTCA CGCTGGCGCC AAGAGCTTCT
501 ACAAGAACCT GATCTGGCTG GTCAAGAAGG GCAACAGTA CCCCAAATG
551 AGCAAGAGCT ACATCAACGA CAAGGGCAA GAAGTGTGG TGCTGTGGGG
601 CATCCACCAC CCTAGCACCA GCGCCGACCA GCAGAGCCTG TACCAGAACG
651 CCGACGCCA CGTGTTCGTG GGCAGCAGCC GGTACAGCAA GAAGTTCAAG
701 CCCGAGATCG CCATCAGACC CAAAGTGC GGACCAAGAG GCCGGATGAA
751 CTACTACTGG ACCCTGGTGG AGCCCGGCGA CAAGATCACC TTCGAGGCCA
801 CCGGCAATCT GGTCTGCCCC AGATACGCC TCGCCATGGA AAGAAACGCC
851 GGCAGCGGCA TCATCATCAG CGACACCCCC GTGCACGACT GCAACACCAC
901 CTGTACAGACC CCCAAAGGGC CCATCAACAC CAGCCTGCC TTCAGAACAA
951 TCCACCCCAT CACCATCGGC AAGTGCCCTA AGTACGTGAA GTCTACCAAG
1001 CTGAGGCTGG CCACAGGCC TCGGAAACATC CCCAGCATCC AGAGCAGAGG
1051 CCTGTTTGGC GCCATTGCCG GCTTTATCGA GGGCGGCTGG ACCGGAATGG
1101 TGGATGGATG GTATGGCTAC CACCACCAGA ATGAGCAGGG AAGCGGCTAC
1151 GCCGCCGACC TGAAGTCCAC ACAGAACGCC ATCGACGAGA TCACCAACAA
1201 AGTGAACTCA GTGATCGAGA AGATGAACAC CCAAGTTCACC GCCGTGGGCA
1251 AAGAATTC AAACCTGGAA AAGCGGATCG AGAACCTGAA CAAGAAGGTG
1301 GACGACGGCT TCCTGGACAT CTGGACCTAC AACGCCGAGC TGCTCGTGCT
1351 GCTGGA AAAC GAGCGGACCC TGGACTACCA CGACTCCAAC GTGAAGAATC
1401 TGTACGAGAA AGTTCGCTCC CAGCTGAAGA ACAACGCCAA AGAGATCGGC
1451 AACGGTGTGCT TCGAGTTCTA CCACAAGTGC GACAACACCT GTATGGAAAG
1501 CGTGAAGAAC GGCACCTACG ACTACCCCAA GTACAGCGAG GAAGCCAAGC
1551 TGAACCGGGA AGAGATCGAC GGCGTGGATA TCAGATCTCT GGTGCCAAGA
1601 GGATCTCCAG GATCTGGATA CATCCCAGAG GCTCCAAGAG ATGGACAAGC
1651 TTACGTGAGA AAGGACGGAG AGTGGGTGCT GCTGTCTACT TTCCTGGGAC
1701 ACCACCACCA CCACCACTAA

```

(SEQ ID NO: 7)

5 Se utilizó un ensayo de inhibición de la hemaglutinación para detectar si los antisueros de la vacuna H1 (vacuna Pandemic 2009 A(H1N1)) pueden inhibir la capacidad del virus WSN(H1N1) de aglutinar glóbulos rojos. Tal como se muestra en la Figura 18A, los antisueros de la vacunación con HA monoglicosilada (HA<sub>mg</sub>) de H1 (cepa de vacuna Pandemic 2009 A(H1N1)) demostraron una mejor capacidad de inhibir la capacidad del virus WSN (H1N1) de aglutinar glóbulos rojos que la HA totalmente glicosilada (HA<sub>tg</sub>) y HA no glicosilada (HA<sub>ug</sub>).

Se utilizó un ensayo de microneutralización para detectar si los antisueros de la vacunación con H1 (cepa de vacuna Pandemic 2009 A(H1N1)) pueden neutralizar la capacidad del virus WSN (H1N1) de infectar células MDCK. Tal

como se muestra en la Figura 18B, la HA monoglicosilada (HA<sub>mg</sub>) de H1 (cepa de vacuna Pandemic 2009 A(H1N1)) demostró una mejor capacidad para neutralizar la capacidad del virus WSN (H1N1) de infectar células MDCK que la HA totalmente glicosilada (HA<sub>tg</sub>) y HA no glicosilada (HA<sub>ug</sub>).

- 5 Se utiliza un experimento de enfrentamiento al virus para demostrar que la vacunación con HA monoglicosilada de H1 (cepa de vacuna Pandemic 2009 A(H1N1)) puede proteger frente a WSN (H1N1) 1933 o A/Puerto Rico/8/34 (H1N1): Enfrentamiento al virus PR8. HA monoglicosilada (cepa de vacuna Pandemic 2009 A(H1N1)) como vacuna protege a los ratones BALB/c del virus WSN (H1N1) o PR8. Por el contrario, la HA totalmente glicosilada, que está presente en las vacunas tradicionales contra la gripe hechas a partir de virus inactivados, no revela capacidad de protección cruzada contra la infección por virus WSN (H1N1) o PR8.
- 10 HA parcialmente glicosilada (p. ej., monoglicosilada) de otras cepas del virus de la gripe también se puede utilizar para formular vacunas potentes activas en la prevención o reducción de infecciones por una o más cepas o subtipos del virus de la gripe. La secuencia codificante de HA de la gripe de cualquier número puede aislarse y modificarse para la expresión tal como se describe en el Ejemplo 1. Luego, la HA se clona y se expresa en un sistema de expresión eucariota y luego se somete a desglicosilación para retener una a tres glicosilaciones (preferiblemente monoglicosiladas) en un sitio de glicosilación.
- 15

La Tabla 4 muestra la secuencia consenso de la H1 A del-TM-FH6 modificada, en que la secuencia del péptido señal está subrayada y en negrita, el sitio de escisión de la trombina está en cursiva, la secuencia de trimerización de foldon de la fibritina del bacteriófago T4 y la etiqueta His está subrayada, y la secuencia del enlazador está en negrita y subrayada.

20 Tabla 4. Secuencia de hemaglutinina consenso H1 A del-TM-FH6

Secuencia consenso de aminoácidos de la hemaglutinina H1 A del-TM-FH6 de la gripe	
<u><b>MKVLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLL</b></u>	50
EDSHNGKLCLLKGIAPLQLGNCVAGWILGNPECELLISKESWSYIVETP	100
NPENGTCPYPGYFADYEELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNTVTKGVS	150
ASC SHNGKSSFYRNLLWLTGKNGLYPNLSKSYANNKEKEVLVLWGVHHP	200
NIGDQALYHTENAYVSVSSHYSRRFTPEIAKRPKVRDQEGRINYWTL	250
LEPGDTIIIFEANGNLIAPRYAFALSRGFGSGIITSNAPMDECDKQTPQ	300
GAINSSLPFQNVHPVTIGECPKYVRSTKLRMVTGLRNIPSIQSRGLFGAI	350
AGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVI	400
EKMNTQFTAVGKEFNKLERRMENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENER	450
TLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGT	500
YDYPKYSEESKLNREKIDGV <u><b>DIRS</b></u> <i>LVPRGS</i> <u><b>PGSGYIPEAPRDGOAYVRKD</b></u>	550
<u><b>GEVLLSTFLGHHHHH</b></u> (SEQ ID NO: 8)	

Secuencia consenso de aminoácidos de la hemaglutinina H1 A del-TM-FH6 de la gripe					
1	ATGAAGGTGA	AACTGCTGGT	GCTGCTGTGC	ACCTTCACCG	CCACCTACGC
51	CGACACCATC	TGCATCGGCT	ACCACGCCAA	CAACAGCACC	GACACCGTGG
101	ATACCGTGCT	GGAAAAGAAC	GTGACCGTGA	CCCACAGCGT	GAACCTGCTG
151	GAAGATAGCC	ACAACGGCAA	GCTGTGCCTG	CTGAAGGGCA	TTGCCCCCT
201	GCAGCTGGGC	AACTGTAGCG	TGGCCGGCTG	GATTCTGGGC	AACCCCGAGT
251	GCGAGCTGCT	GATCAGCAAA	GAGTCCTGGT	CCTACATCGT	GGAGACACCC
301	AACCCCGAGA	ACGGCACCTG	TTACCCCGGC	TACTTCGCCG	ACTACGAGGA
351	ACTGAGAGAG	CAGCTGTCTT	CTGTCTCCAG	CTTCGAGCGG	TTCGAGATCT
401	TCCCCAAAGA	GAGCAGCTGG	CCCAACCACA	CCGTGACAAA	GGGCGTGAGC
451	GCCAGCTGCT	CCCACAATGG	CAAGAGCAGC	TTCTACCGGA	ACCTGCTGTG
501	GCTGACCGGC	AAGAACGGCC	TGTACCCCAA	CCTGAGCAAG	AGCTATGCCA
551	ACAACAAAGA	GAAAGAGGTC	CTCGTCCTCT	GGGGCGTGCA	CCACCCCCCC
601	AACATCGGCG	ACCAGCGGGC	CCTGTACCAC	ACCGAGAACG	CCTACGTGTC
651	CGTGGTGTCC	AGCCACTACA	GCAGACGGTT	CACCCCGAG	ATCGCCAAGA
701	GGCCCAAAGT	GCGGGACCAG	GAAGGCCGGA	TCAACTACTA	CTGGACCCTG
751	CTGGAACCCG	GCGACACCAT	CATCTTCGAG	GCCAACGGCA	ACCTGATCGC
801	CCCCAGATAC	GCCTTTGCC	TGAGCAGAGG	CTTCGGCAGC	GGCATCATCA
851	CCAGCAACGC	CCCCATGGAC	GAGTGCACG	CCAAGTGTC	GACCCCCAG
901	GGCGCCATCA	ACAGCAGCCT	GCCCTTCCAG	AACGTGCACC	CCGTGACCAT
951	CGGCGAGTGC	CCTAAGTACG	TGCGGAGCAC	CAAGCTGAGA	ATGGTGACCG
1001	GCCTGCGGAA	CATCCCAGC	ATCCAGAGCA	GAGGCCTGTT	TGGCGCCATT
1051	GCCGGCTTTA	TCGAGGGCGG	CTGGACCGGA	ATGGTGGACG	GGTGGTACGG
1101	CTACCACCAC	CAGAATGAGC	AGGGCAGCGG	CTACGCCGCC	GATCAGAAGT
1151	CCACCAGAA	CGCTATCAAC	GGCATCACCA	ACAAAGTGAA	CAGCGTGATC
1201	GAGAAGATGA	ACACCCAGTT	CACCGCCGTG	GGCAAAGAGT	TCAACAAGCT
1251	GGAACGGCGG	ATGGAAAACC	TGAACAAGAA	GGTGGACGAC	GGCTTCCTGG
1301	ACATCTGGAC	CTACAACGCC	GAGCTGCTGG	TCCTGCTGGA	AAACGAGCGG
1351	ACCCTGGACT	TCCACGACAG	CAACGTGAAG	AACCTGTACG	AGAAAGTGAA
1401	GTCCAGCTG	AAGAACAACG	CCAAAGAGAT	CGGCAACGGC	TGCTTCGAGT
1451	TCTACCACAA	GTGCAACGAC	GAGTGCATGG	AAAGCGTGAA	GAACGGCACA
1501	TACGACTACC	CCAAGTACAG	CGAGGAAAGC	AAGCTGAACC	GGGAGAAGAT
1551	CGACGGCGTG	GATATCAGAT	CTCTGGTGCC	AAGAGGATCT	CCAGGATCTG
1601	GATACATCCC	AGAGGCTCCA	AGAGATGGAC	AAGCTTACGT	GAGAAAAGGAC
1651	GGAGAGTGGG	TGCTGCTGTC	TACTTTCCTG	GGACACCACC	ACCACCACCA
1701	CTAA	(SEQ ID NO: 9)			

La Tabla 5 muestra la secuencia consenso de la H1-C del-TM-FH6 modificada, en que la secuencia del péptido señal está subrayada y en negrita, el sitio de escisión de la trombina está en cursiva, la secuencia de trimerización de foldon de la fibrinina del bacteriófago T4 y la etiqueta His está subrayada, y la secuencia del enlazador está en negrita y subrayada.

Tabla 5. Secuencia consenso de hemaglutinina H1-C del-TM-FH6

Secuencia consenso de aminoácidos de la hemaglutinina H1-C del-TM-FH6 de la gripe	
MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLL	50
EDSHNGKLCLLKGIAPLQLGNC SVAGWILGNPECELLISKESWSYIVETP	100
NPENGTCPYGFH FADYEELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHDTVTGVS	150
ASC SHNGESSFYRNLLWLTGKNGLYPNLSKSYANNKEKEVLVLWGVHHP	200
NIGDQKALYHTENAYVSVSSHYSRKFTPEIAKRPKVRDQEGRINYWTL	250
LEPGDTIIFEANGNLIAPRYAFALSRGFGSGIINSNAPMDKCDAKCQTPQ	300
GAINSSLFPQNVHPVTIGECPKYVRS AKLRMTGLRNIPSIQSRGLFGAI	350
AGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVI	400
EKMNTQFTAVGKEFNKLERRMENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENER	450
TLDFHDSNVKNLYEKVKSQ LKNNAKEIGNGC FEFYHKCNDECMESVKNGT	500
YDYPKYSEESKLNREKIDGV <b>DIRSLVPRGSPGSGYIPEAPRDGQAYVRKD</b>	550
<u>GEWVLLSTFLGHHHHH</u> (SEQ ID NO: 10)	
Secuencia de nucleótidos de la hemaglutinina H1-C del-TM-FH6 de la gripe	
1 ATGAAGGTGA AACTGCTGGT GCTGCTGTGC ACCTTCACCG CCACCTACGC	
51 CGACACCATC TGCATCGGCT ACCACGCCAA CAACAGCACC GACACCGTGG	
101 ATACCGTGCT GGAAAAGAAC GTGACCGTGA CCCACAGCGT GAACCTGCTG	
151 GAAGATAGCC ACAACGGCAA GCTGTGCCTG CTGAAGGGCA TTGCCCCCT	
201 GCAGCTGGGC AACTGTAGCG TGGCCGGCTG GATTCTGGGC AACCCGAGT	

Secuencia consenso de aminoácidos de la hemaglutinina H1-C del-TM-FH6 de la gripe					
251	GCGAGCTGCT	GATCTCCAAA	GAGTCCTGGT	CTTACATCGT	GGAGACACCC
301	AACCCCGAGA	ACGGCACCTG	TTACCCCGGC	CACTTCGCCG	ACTACGAGGA
351	ACTGCGGGAG	CAGCTGAGCA	GCGTGTCCAG	CTTCGAGCGG	TTCGAGATCT
401	TCCCCAAAGA	GAGCAGCTGG	CCCAACCACG	ATACCGTGAC	CGGCGTGAGC
451	GCCAGCTGTT	CCCACAACGG	CGAGAGCAGC	TTCTACCGGA	ACCTGTGTGTG
501	GCTGACCGGC	AAGAACGGCC	TGTACCCCAA	CCTGAGCAAG	AGCTATGCCA
551	ACAACAAAGA	GAAGGAAGTC	CTGGTCCTCT	GGGGCGTGCA	CCACCCCCCC
601	AACATCGGCG	ACCAGAAGGC	CCTGTACCAC	ACCGAGAACG	CCTACGTGTC
651	CGTGGTGTCC	AGCCACTACA	GCCGGAAGTT	CACCCCGGAG	ATCGCCAAGA
701	GGCCCAAAGT	GCGGGACCAG	GAAGGCCGGA	TCAACTACTA	CTGGACCCTG
751	CTGGAACCCG	GCGACACCAT	CATCTTCGAG	GCCAACGGCA	ACCTGATCGC
801	CCCCAGATAC	GCCTTTGCC	TGAGCAGAGG	CTTCGGCAGC	GGCATCATCA
851	ACAGCAACGC	CCCCATGGAC	AAGTGCAGC	CCAAGTGCCA	GACACCCAG
901	GGCGCCATCA	ACAGCTCCCT	GCCCTTCCAG	AACGTGCACC	CCGTGACCAT
951	CGCGGAGTGC	CCTAAGTACG	TGCGGAGCGC	CAAGCTGAGA	ATGGTGACCG
1001	GCCTGCGGAA	CATCCCAGC	ATCCAGAGCA	GAGGCCTGTT	TGGCGCCATT
1051	GCCGGCTTTA	TCGAGGGCGG	CTGGACCGGA	ATGGTGGACG	GGTGGTACGG
1101	CTACCACCAC	CAGAATGAGC	AGGGCAGCGG	CTACGCCGCC	GATCAGAAGT
1151	CCACCAGAA	CGCCATCAAC	GGCATCACCA	ACAAAGTGAA	CAGCGTGATC
1201	GAGAAGATGA	ACACCCAGTT	CACCGCCGTG	GGCAAAGAGT	TCAACAAGCT
1251	GGAACGGCGG	ATGGAAAACC	TGAACAAGAA	GGTGGACGAC	GGCTTCCTGG
1301	ACATCTGGAC	CTACAACGCC	GAGCTGCTGG	TGCTGCTGGA	AAACGAGCGG
1351	ACCCTGGACT	TCCACGACAG	CAACGTGAAG	AACCTGTACG	AGAAAGTGAA
1401	GTCCAGCTG	AAGAACAACG	CCAAGAGAT	CGGCAACGGC	TGCTTCGAGT
1451	TCTACCACAA	GTGCAACGAC	GAGTGCATGG	AAAGCGTGAA	GAACGGCACA
1501	TACGACTACC	CCAAGTACAG	CGAGGAAAGC	AAGCTGAACC	GGGAGAAGAT
1551	CGACGGCGTG	GATATCAGAT	CTCTGGTGCC	AAGAGGATCT	CCAGGATCTG
1601	GATACATCCC	AGAGGCTCCA	AGAGATGGAC	AAGCTTACGT	GAGAAAGGAC
1651	GGAGAGTGGG	TGCTGCTGTC	TACTTTCCTG	GGACACCACC	ACCACCACCA
1701	CTAA	(SEQ ID NO: 11)			

5 Las vacunas generadas a partir de los péptidos HA desglucosilados de la presente descripción exhiben actividad antiviral contra virus respiratorios, incluido el virus sincitial respiratorio (RSV) y diversos tipos de gripe, tales como la gripe A y la gripe B. Ventajosamente, los péptidos antivirales de la presente divulgación exhiben actividad antiviral contra numerosas cepas de la gripe, incluidas las estacionales, la aviar (p. ej., cepas H5N1) y las gripes porcinas. Las enfermedades resultantes de las infecciones por estos virus también se pueden prevenir o tratar de acuerdo con algunos de los métodos descritos.

(C) Sitios de glicosilación en la proteína H1/HA.

10 Las moléculas de la gripe H1 de HA tienen cuatro sitios antigénicos distintos: Sa, Sb, Ca, y Cb (Luoh SM, et al (1992) J Virol 66:1066-1073). Estos sitios consisten en los aminoácidos más variables en la molécula de HA de los virus H1N1 humanos estacionales que han sido sometidos a presión inmunitaria mediada por anticuerpos desde su aparición en 1918.

15 Utilizando ensayos de inhibición de la hemaglutinación (HI) y estudios de vacunación/exposición, se demostró que el virus H1N1 pandemic 2009 es antigénicamente similar a los virus H1N1 humanos que circulaban desde 1918-1943 y a los virus H1N1 porcino clásicos. Se descubrió que los anticuerpos contra las vacunas H1N1 porcinas clásicas o similares a 1918 protegían completamente a los ratones C57B/6 del enfrentamiento letal con el aislado del virus de la gripe A/Netherlands/602/2009. Se descubrió que la inmunización pasiva con anticuerpos monoclonales (mAb) de

reacción cruzada generados contra las proteínas HA de 1918 o A/California/04/2009 ofrecían protección completa contra la muerte. El análisis de los mutantes de escape de anticuerpos mAb, generado por la selección del virus H1N1 2009 con estos mAbs, indica que el sitio antigénico Sa es uno de los epítomos de protección cruzada conservados. (Manicassamy B., et al. PLoS Pathogens enero de 2010 | Volumen 6 | Número 1 | e1000745).

5 Mediante el modelo de homología de la estructura de HA se ha demostrado que las HAs de H1N1 de 2009 y el virus  
pandémico de 1918 comparten un número significativo de residuos aminoácidos en sitios antigénicos conocidos, lo  
que sugiere la existencia de epítomos comunes para neutralizar anticuerpos de reacción cruzada a ambas HAs.  
(Igarashi M. et al., PLoS ONE, enero de 2010, Volumen 5, Número 1, e8553). Existe un sitio potencial de  
10 glicosilación en el residuo Asn177 en HA, que está dentro de la región Sa conservada antigénicamente. (Véase la  
Fig. 19). Las proteínas que portan una mutación en el sitio de glicosilación Asn177 dentro de la HA de Brisbane H1  
se utilizan para inmunizar ratones. Se mide la protección cruzada contra NIBRG-121.

Antisueños de la vacunación con HA monoglicosilada (HA<sub>mg</sub>) portadora de una mutación en Asn177 de H1 (Brisbane)  
demuestran una mejor capacidad para inhibir la capacidad del virus NIBRG-121 de aglutinar glóbulos rojos que la  
15 HA totalmente glicosilada (HA<sub>tg</sub>) portadora de una mutación en Asn177 y HA no glicosilada (HA<sub>ug</sub>) portadora de una  
mutación en Asn177. La HA monoglicosilada (HA<sub>mg</sub>) que porta una mutación en Asn177 de H1 (Brisbane) demuestra  
una mejor capacidad para neutralizar la capacidad del virus NIBRG-121 de infectar células MDCK que la HA  
totalmente glicosilada (HA<sub>tg</sub>) que porta una mutación en Asn177 y la HA no glicosilada (HA<sub>ug</sub>) portadora de una  
mutación en Asn177. La HA mono-glicosilada (Brisbane) como vacuna protege a ratones BALB/c del enfrentamiento  
20 al virus NIBRG-121. Por el contrario, la HA totalmente glicosilada portadora de una mutación en Asn177 revela poca  
o ninguna capacidad de protección cruzada contra la infección por el virus NIBRG-121.

Tal como se utiliza en esta memoria, "actividad terapéutica" o "actividad" puede referirse a una actividad, cuyo efecto  
es consistente con un resultado terapéutico deseable en seres humanos, o a efectos deseados en mamíferos no  
humanos o en otras especies u organismos. La actividad terapéutica se puede medir in vivo o in vitro. Por ejemplo,  
se puede analizar un efecto deseable en cultivo celular.

25 La "actividad antiviral" de una vacuna de acuerdo con la presente divulgación designa la capacidad de la vacuna de  
generar una respuesta inmunitaria en un sujeto al que se administra la vacuna, en donde la respuesta inmunitaria es  
suficiente para prevenir o tratar o mejorar la infección viral completamente desarrollada y/o síntomas asociados con  
la infección por un virus, tal como un virus de gripe. Ventajosamente, las vacunas generadas a partir de los péptidos  
30 HA desglucosilados de la presente divulgación pueden demostrar una actividad antiviral significativa contra el virus  
de la gripe. Tal como se utiliza en esta memoria, "actividad antiviral significativa" se puede medir por la capacidad de  
la vacuna de inhibir la hemaglutinación viral en al menos aproximadamente un 50%, en comparación con muestras  
de virus tratadas simuladamente. En determinadas realizaciones, el péptido antiviral inhibe la hemaglutinación viral  
en al menos aproximadamente un 60%, más preferiblemente en al menos aproximadamente un 70%, más  
preferiblemente en al menos aproximadamente un 80%, más preferiblemente en al menos aproximadamente un  
35 90% y más preferiblemente en al menos aproximadamente un 95%, en comparación con las muestras de virus  
tratadas simuladamente.

Métodos para demostrar el efecto inhibitor de las composiciones antivirales sobre la replicación viral son bien  
conocidos en la técnica. La eficacia terapéutica de las vacunas de la presente invención como agentes antivirales  
40 puede demostrarse en animales de laboratorio, por ejemplo, utilizando un modelo murino. (Véase, p. ej., Jones, et  
al., J. Virol, 2006, Vol. 80, Nº 24, págs. 11960-11967). Adicionalmente, el efecto terapéutico de los péptidos  
farmacológicamente activos de la presente invención se puede demostrar en seres humanos a través de técnicas  
conocidas en la técnica.

Los anticuerpos neutralizantes de la presente invención se pueden utilizar adicionalmente como una herramienta  
para el mapeo de epítomos de determinantes antigénicos del virus de la gripe A, y son útiles en el desarrollo de  
45 vacunas. De hecho, tal como se demuestra en los ejemplos que figuran más adelante, los autores de la invención en  
esta memoria han identificado varios anticuerpos neutralizantes ampliamente reactivos que pueden utilizarse como  
guías para el diseño de vacunas.

Por lo tanto, los anticuerpos neutralizantes de la presente invención pueden utilizarse para seleccionar péptidos o  
polipéptidos que imitan funcionalmente a los epítomos de neutralización a los que se unen los anticuerpos, que, a su  
50 vez, pueden convertirse en vacunas contra la infección por el virus de la gripe A. En una realización, la presente  
invención proporciona una vacuna eficaz contra un virus de la gripe A que comprende un péptido o polipéptido que  
imita funcionalmente a un epítomo de neutralización unido por un anticuerpo descrito en esta memoria. En una  
realización, la vacuna comprende un péptido o polipéptido que imita funcionalmente a un epítomo de neutralización  
unido por un anticuerpo que se une a un antígeno de hemaglutinina (HA). En otra realización, la vacuna puede ser  
55 sintética. En otras realizaciones, la vacuna puede comprender (i) un virus de la gripe A atenuado, o una parte del

mismo; o (ii) un virus de la gripe A exterminado o parte del mismo. En otra realización, la vacuna comprende un péptido o polipéptido que imita funcionalmente a un epítipo de neutralización unido por un anticuerpo que se une a un antígeno de hemaglutinina (HA). El antígeno HA puede ser un subtipo H5 o un subtipo H1. En algunas realizaciones, el antígeno HA se muestra en la superficie del virus de la gripe A.

5 Vacunas contra el Virus de la Gripe

Las secuencias del sitio de N-glicosilación de la HA H5 de la gripe están altamente conservadas. La HA H5 tiene 15 sitios de N-glicosilación total que tienen la secuencia prototípica NX-(S/T). Cada uno de los monómeros tiene 5 sitios de N-glicosilación en las posiciones N27, N39, N170, N181 y N500. La unión del receptor del huésped se ve afectada por los glicanos en la estructura de HA. HA H5 tiene sitios de glicosilación en las posiciones 39, 127, 170, 181 y 500.

Las vacunas de la invención pueden generarse utilizando versiones parcialmente glicosiladas de cualquier proteína de la superficie del virus de la gripe, incluyendo HA, NA y M2. Las proteínas neuraminidasa (NA) del virus de la gripe A se muestran en su superficie. La proteína M2 del virus de la gripe A es una proteína de la membrana integral de 97 aminoácidos que se expresa en la superficie de las células infectadas con un dominio N-terminal extracelular de 18 a 23 residuos aminoácidos, un dominio hidrofóbico interno de aproximadamente 19 residuos y un dominio citoplasmático C-terminal de 54 residuos. (Zebedee SL, et al. J. Virol. Agosto de 1988 62(8):2762-2772).

Además, las proteínas de la gripe parcialmente glicosiladas se pueden generar alterando el patrón de glicosilación en los sitios de N- u O-glicosilación de la proteína utilizada como antígeno.

En otra realización, los péptidos o polipéptidos de la vacuna contienen determinantes antigénicos que aumentan los anticuerpos neutralizantes del virus de la gripe A.

En un aspecto más general, las moléculas neutralizantes, que incluyen pero no se limitan a anticuerpos, son útiles para prevenir o tratar infecciones virales. Por lo tanto, las moléculas neutralizantes de la presente invención son útiles en inmunoterapia, tal como inmunización pasiva utilizando una o más de estas moléculas, y en el desarrollo de vacunas dirigidas a la o las dianas antigénicas virales.

La presente proporciona composiciones de vacunas para la prevención y el tratamiento de infecciones provocadas por el virus neutralizado de la gripe aviar. Si bien se sabe desde hace más de 80 años que la administración pasiva de sueros inmunes puede prevenir la infección Luke, T.C. et al., Kilbane E.M., Jackson J.L. y Hoffman S.L. (2006) Ann Intern Med 145, 599-609), estudios más recientes con anticuerpos monoclonales también ofrecen estímulo (Hanson, B.J. et al. (2006) Respir Res 7, 126; Huang, C.C. et al. (2004) Proc. Nat. Acad. Sci. 101, 2706-2711; Simmons C.P. et al. (2007) PLoS Med 4, e178). Por ejemplo, Hanson et al. demostraron que un anticuerpo monoclonal contra el virus H5N1 era protector contra la infección letal, incluso cuando se administraba tres días después de la inoculación en ratones (Hanson, B.J. et al. (2006) Respir Res 7, 126).

Dada la posibilidad de una epidemia catastrófica, se ha sugerido que los gobiernos deberían mantener reservas de anticuerpos neutralizantes como los que se reseñan aquí. Los hechos de que los anticuerpos son completamente humanos y han sido aislados de individuos que combatieron con éxito la infección viral pueden ofrecer ventajas. Sin embargo, incluso si dichos anticuerpos están almacenados, si mutara el gen que codifica el epítipo al que se une el anticuerpo, entonces el anticuerpo podría ser menos efectivo. Además, existe cierta evidencia de que la inmunidad celular mejora la eliminación del virus. Sin embargo, si el único efecto de la inmunización pasiva fuera disminuir la gravedad de la infección, dando así el tiempo necesario para que funcionen otros efectores inmunes, podría ser de importancia crítica para disminuir la mortalidad en pacientes con sistemas inmunitarios, cardiovasculares y respiratorios debilitados y en la vejez. La inmunización pasiva podría prevenir la tormenta de citoquinas contra los virus que proliferan rápidamente tal como ocurrió incluso en adultos jóvenes sanos durante el brote de gripe de 1918.

Vacunas contra el Virus Sincitial Respiratorio (RSV)

El virus sincitial respiratorio (RSV) humano es un virus que provoca infecciones del tracto respiratorio. Es la principal causa de infección del tracto respiratorio inferior y visitas al hospital durante la infancia y la niñez. El RSV es un virus de ARN con envoltura de la familia *Paramyxoviridae* y del género *Pneumovirus*. No existe vacuna.

El virión del RSV comprende tres glicoproteínas de la superficie, tres glicoproteínas de la superficie, F, G y SH (pequeño hidrofóbica). Las proteínas F en la superficie del virus hacen que las membranas celulares de las células cercanas se fusionen, formando sincitios. Las glicoproteínas F (fusión) y G (fijación) son necesarias para la entrada viral en las células y también determinan la respuesta de anticuerpos. La estructura y composición de RSV ha sido

aclarada y se describe en detalle en el libro de texto "Fields Virology", ed. Knipe, D.M. et al., Lippincott Williams & Wilkins, NY (2001), en particular, Capítulo 45, págs. 1443-1485, "Respiratory Syncytial Virus" por Collins, P., Chanock, R.M. y Murphy, B.R.

- 5 La proteína G de RSV, que está 33 kDa no glicosilada, se procesa a aproximadamente 90 kDa cuando está completamente glicosilada (glicosilaciones enlazadas tanto a N como a O). Las proteínas F y G existen como un complejo proteico en la superficie de células infectadas con RSV. (Low K-W et al. Biochem. Biophys. Res. Comm. 366 (2) 2008, 308-313).

La Tabla 6 indica la secuencia de la glicoproteína G de RSV con sitios potenciales de N-glicosilación subrayados.

Tabla 6. Secuencia polipeptídica de glicoproteína G de RSV

MSKNKDQRTT	KTLEKTWDTL	NHLLFISSCL	YKLNLSIAQ	ITLSILAMII	STSLIIAAII	60
FIASANHKVT	LTTAIIQDAT	SQIKNTTPTY	LTQNPQLGIS	FSNLSETTSQ	TTTILASTTP	120
SVKSTLQSTT	VTKNTTTTK	IQPSKPTTKQ	RQNKPPNKP	NDFHFEVFNF	VPCSICSNP	180
TCWAICKRIP	NKKPGKTTT	KPTKKPTIKT	TKKDLKPQT	KPKEVPTTKP	TEKPTINTTK	240
TNIRTTLLTN	NTTGNPEHTS	QKGLHSTSS	DGNPSPSQVY	TTSEYLSQPP	SPSNTTNQ	298
(SEQ ID NO:12)						

- 10 Las glicoproteínas F y G de RSV parcialmente desglicosiladas podrían ser útiles como vacunas contra el RSV más eficaces.

#### Vacunas contra el Flavivirus

- 15 Flavivirus es un género de la familia *Flaviviridae*. Los flavivirus son pequeños virus de ARN con envoltura que utilizan artrópodos tales como los mosquitos para su transmisión a sus huéspedes vertebrados, e incluyen el virus de la fiebre amarilla (YFV), el virus del Nilo Occidental (WNV), el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, el virus de la encefalitis japonesa (JE) y virus del virus Dengue 2 (Weaver SC, Barrett AD Nat. Rev. Microbiol. 2 789-801 2004). Los flavivirus consisten en tres proteínas estructurales: la proteína C de la nucleocápside central y las glicoproteínas M y E de la envoltura. La glicoproteína E es una proteína de fusión viral de clase II que media tanto en la unión al receptor como en la fusión. Las proteínas de fusión viral de clase II se encuentran en flavivirus y alfavirus.

- 20 La glicoproteína E se compone de tres dominios: el dominio I (dominio de dimerización) es un barril beta de 8 cadenas, el dominio II (dominio central) es un dominio alargado compuesto por doce cadenas beta y dos hélices alfa y el dominio III (dominio tipo inmunoglobulina) es un módulo similar a IgC con diez cadenas beta. Los dominios I y II están entrelazados.

- 25 Los dímeros de la glicoproteína E de 495 AA en la superficie viral se reagrupan irreversiblemente en trímeros competentes en la fusión tras la exposición a pH bajo tal como se encuentra en el entorno ácido del endosoma. La formación de trímeros da como resultado un cambio conformacional que resulta en la exposición de un bucle de péptido de fusión en la punta del dominio II, que se requiere en la etapa de fusión para unir las membranas celular y viral mediante la inserción en la membrana (Modis Y et al. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100 6986-91 2003).

- 30 La proteína (E) de la envoltura del virus Dengue contiene dos sitios de glicosilación principales enlazados a N, en Asn-67 y Asn-153. El sitio de glicosilación en la posición 153 se conserva en la mayoría de los flavivirus, mientras que se cree que el sitio en la posición 67 es único para los virus Dengue. Las cadenas laterales de oligosacáridos enlazados a N en proteínas E de flavivirus se han asociado con morfogénesis viral, infectividad y tropismo. Los virus Dengue que carecen de N-glicosilación en la posición 67 muestran una infección reducida de las células humanas. (Mondotte JA, y col., *J. Virol.* 81(3):7136-7148 (2007).

- 35 La Tabla 7 indica la secuencia de la glicoproteína E del virus Dengue con sitios potenciales de N-glicosilación en N-67 y N-153 subrayados.

40

Tabla 7. Secuencia polipeptídica de glicoproteína E del virus Dengue

MRCVGIGNRD	FVEGLSGATW	VDVVLEHGSC	VTTMAKNKPT	LDIELLKTEV	TNPAVLRKLC	60
IEAKISNTTT	DSRCPTQGEA	TLVEEQDANF	VCRRTFVDRG	WNGCGLFGK	GSLLTCAKFK	120
CVTKLEGKIV	QYENLKYSVI	VTVHTGDQHQ	VGNETTEHGT	IATITPQAPM	SEIQLTDYGA	180
LTLDCSPRTG	LDFNEMVLLT	MKEKSWLVHK	QWFLLDPLPW	TSGASTSQET	WNRQDLLVTF	240
KTAHAKKQEV	VVLGSQEGAM	HTALTGATEI	QTSGTTTIFA	GHLKCRKMD	KLTLKGVSYV	300
MCTGSFKLEK	EVAETQHGTV	LVQVKYEGTD	APCKIPFSTQ	DEKGVTONGR	LITANPIVTD	360
KEKPVNIETE	PPFGESYIVI	GAGEKALKLS	WFKKGSSIGK	MFEATARGAR	RMAILGDTAW	420
DFGSIGGAFT	SVGKLVHQVF	GTAYGVLFSG	VSWTMKIGIG	ILLTWLGLNS	RSTSLSMTCI	480
AVGMVTLYLG	VVVQA	495				
(SEQ ID NO:13)						

5 Por lo tanto, la desglicosilación parcial de la glicoproteína E del virus Dengue puede utilizarse para generar vacunas más eficaces y amplias contra los flavivirus. El resultado de la desglicosilación parcial de los dímeros de la proteína E del virus Dengue tipo 3 se muestra en el modelo representado en la Figura 21A-B. La Figura 21B muestra la proteína E monoglicosilada del Dengue.

10 El virus de la Hepatitis C (HCV) es el principal agente etiológico de la infección post-transfusión humana y no-A adquirida en la comunidad, hepatitis no-B, infectando probablemente al 1% de toda la población del mundo. El HCV es un miembro de la familia *Flaviviridae* que incluye los flavivirus y los pestivirus (Miller RH y Purcell RH, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 87, 2057-2061 1990).

15 El genoma del virus de la hepatitis C (HCV) codifica dos glicoproteínas de la envoltura asociadas a la membrana (E1 y E2), que interactúan para formar un complejo heterodimérico no covalente. Las glicoproteínas del HCV, E1 y E2, están fuertemente modificadas por la glicosilación enlazada a N. La proteína E1 consiste en 192 aminoácidos y contiene de 5 a 6 sitios de N-glicosilación, dependiendo del genotipo del HCV. La proteína E2 consiste en 363 a 370 aminoácidos y contiene 9-11 sitios de N-glicosilación, dependiendo del genotipo del HCV. (Maertens G. y Stuyver L. Genotypes and genetic variation of hepatitis C virus. En: The molecular medicine of viral hepatitis. Ed: Harrison T. J. y Zuckerman A. J. 1997).

20 Un estudio reciente ha revelado que tras la desglicosilación parcial con endoglicosidasa H solo se utilizan cuatro de los cinco sitios potenciales de glicosilación en las posiciones de aminoácidos 196, 209, 234, 305 y 325, respectivamente, de la glicoproteína E1 del HCV. Las mutaciones en las posiciones N2 (196) y N3 (234) solo tienen efectos menores en el ensamblaje del complejo E1E2, mientras que una mutación en la posición N1 (196) y predominantemente en la posición N4 (305) reduce drásticamente la eficiencia de la formación de complejos E1E2 no covalentes. (Meunier JC. *et al.*, *J. Gen. Virol.* (1999), 80, **887-896.**)

25 La Tabla 8 indica la secuencia del aislado del virus de la hepatitis C de la glicoproteína E1 de la envoltura HC-J6 (Okamoto, H., *et al.*, *J. Gen. Virol.* 72(11), 2697-2704 (1991)) con potenciales sitios de N-glicosilación en las posiciones 196, 209, 234, 305 y 325 subrayadas.

Tabla 8. Secuencia polipeptídica de glicoproteína E1 del virus de la hepatitis C

AEVKNISTGY	MVTNDCTNDS	ITWQLQAAVL	HVPGCVPCER	VGNTSRCWIP	VSPNVAVQQP	252
GALTQGLRTH	IDMVMSÄTL	CSALYVGDLC	GGVMLAAQMF	IVSPQHWFV	QDCNCSIYPG	312
TITGHRMAWD	MMNNSPTAT	MILAYAMRVP	EVIIDIIGGA	HWGVMFGLAY	FSMQGAWAKV	372
VVILLLAGV	DA					384
(SEQ ID NO:14)						

30 Por lo tanto, la desglicosilación parcial de las glicoproteínas E1 y E2 del HCV puede utilizarse para generar vacunas más eficaces y amplias contra el HCV.

Vacunas contra el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV)

El virus de la inmunodeficiencia humana HIV-1 y HIV-2 y los virus relacionados de inmunodeficiencia en simios (SIV) provocan la destrucción de linfocitos CD4<sup>+</sup> en sus respectivos huéspedes, lo que resulta en el desarrollo del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). La entrada del HIV en las células huésped está mediada por las

glicoproteínas de la envoltura viral, que se organizan en espigas oligoméricas, probablemente triméricas, que se muestran en la superficie del virión. Estos complejos de la envoltura están anclados en la membrana viral por la glicoproteína de la envoltura de la transmembrana gp41. La superficie de la espiga está compuesta principalmente por la glicoproteína de la envoltura exterior, gp120, asociada por interacciones no covalentes con cada una de las subunidades del complejo de glicoproteína gp41 trimérico.

La adición de asparagina (cadenas de polisacáridos enlazadas a N (es decir, glicanos) a las glicoproteínas gp120 y gp41 del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 sobre (HIV-1) no solo es necesaria para el plegamiento de proteínas correcto, sino que también pueden proporcionar protección contra anticuerpos neutralizantes como un "escudo de glucano". (Wei X et al., Nature 422: 307-312, 2003). La glicoproteína de la superficie (gp120) de la envoltura del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1), que representa la interfaz principal entre el virus y el entorno del huésped, es una de las proteínas más glicosiladas conocidas hasta la fecha, con casi la mitad de su peso molecular debido a la adición de glicanos enlazados a N. (Allan JS, et al. Science 228: 1091-1094, 1985). La glicoproteína de la transmembrana (gp41) de la envoltura del HIV-1 también está glicosilada, pero en menor medida. La adición de glicanos enlazados a N es esencial para que la gp120 del HIV-1 se pliegue en la conformación adecuada para unirse al receptor CD4, e influye en la unión de los correceptores alternativos CXCR4 y CCR5, los efectos combinados que median en la fusión y la entrada del HIV-1 en la célula huésped.

Debido a que muchos glicanos enlazados a N son componentes altamente conservados de la envoltura del HIV-1, ellos mismos pueden proporcionar una diana prometedor para neutralizar anticuerpos. El anticuerpo monoclonal humano ampliamente neutralizante 2G12 se une a un epítipo que comprende glicanos enlazados a N que están unidos a la glicoproteína gp120. (Trloka A et al., J Virol 70: 1100-1108, 1996). Las cepas de HIV-1 en las que se han eliminado o modificado experimentalmente sitios de glicosilación enlazados a N pueden volverse más sensibles a la neutralización (Koch et al., 2003 Virology 313: 387-400).

La gp120 madura contiene 24 sitios potenciales para la N-glicosilación tal como se reconoce por la secuencia Asn-Xaa-Ser/Thr (Kornfeld y Kornfeld, Ann Rev. Biochem. 54: 631-664, 1985). La Tabla 9 indica los 24 sitios en la secuencia HXB2 de HIV-1. Los sitios potenciales de N-glicosilación están subrayados.

Tabla 9. Secuencia polipeptídica gp120 del HIV

LWVTVYYGVP	VWKEATTTLF	CASDAKAYDT	EVHNVWATHA	CVPTDPNPQE	VVLVNVTENF	60
NMWKNDMVEQ	MHEDIISLWD	QSLKPCVKLT	PLCVSLKCTD	LKNDTNTNSS	SGRMIMEKGE	120
IKNCSEFNI	ST SIRGKVQKEY	AFFYKLDIIP	IDNDTTSYKL	TSCNTSVITQ	ACPKVSFEPI	180
PIHYCAPAGF	AILKCNKTF	NGTGPCTNVS	TVOCTHGIRP	VVSTOLLNNG	SLAEDEVVIR	240
SVNFTDNAKT	IIVQLN	TSVE INCTRPNNT	RKRIRIQRGP	GRAFVTIGKI	GNMROAHCNI	300
SRAKWNTLTK	QIASKLREQF	GNNKTIIFKQ	SSGGDPEIVT	HSFNCGGEFF	YCNSTQLFNS	360
TWFNSTWSTE	GSNNTGSDT	ITLPCRIKQI	INMWQKVGKA	MYAPPISGQI	RCSSNITGLL	420
LTRDGGNSNN	ESEIFRPGGG	DMRDNRSEL	YKYKVVKIEP	LGVAPTKAKR	RVVQREKR478	

(SEQ ID NO:15)

En la glicoproteína gp41 de la transmembrana de HIV-1 los sitios de glicosilación conservados están en Asn621, Asn630 y Asn642.

Por lo tanto, la desglicosilación parcial de la proteína gp120 de la envoltura del HIV, o la proteína gp41 de la transmembrana se puede utilizar para generar vacunas más eficaces y amplias contra los flavivirus. El resultado de la desglicosilación parcial de los trímeros de proteína gp120 del HIV se muestra en el modelo representado en las Figuras 20A-B. La Figura 20B muestra trímeros de la proteína monoglicosilada gp120 del HIV.

#### Métodos para preparar glicoproteínas de la superficie celular parcialmente glicosiladas

Polinucleótidos de la presente invención, o fragmentos o variantes de los mismos, se preparan fácilmente, por ejemplo, sintetizando directamente el fragmento por medios químicos, tal como se hace comúnmente utilizando un sintetizador de oligonucleótidos automatizado. También, se obtienen fragmentos mediante la aplicación de la tecnología de reproducción de ácido nucleico tal como la tecnología PCR™ de la patente de EE.UU. 4.683.202, introduciendo secuencias seleccionadas en vectores recombinantes para la producción recombinante, y mediante otras técnicas de ADN recombinante generalmente conocidas por los expertos en la técnica de biología molecular.

La invención proporciona vectores y células huésped que comprenden un ácido nucleico de la presente invención, así como técnicas recombinantes para la producción de un polipéptido de la presente invención. Vectores de la invención incluyen aquellos que son capaces de replicarse en cualquier tipo de célula u organismo, incluidos, p. ej., plásmidos, fagos, cósmidos y minicromosomas. En diversas realizaciones, los vectores que comprenden un polinucleótido de la presente invención son vectores adecuados para la propagación o replicación del polinucleótido, o vectores adecuados para expresar un polipéptido de la presente invención. Vectores de este tipo son conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente.

Polinucleótidos de la presente invención se pueden sintetizar, completos o en partes que luego se combinan, y se insertan en un vector utilizando técnicas rutinarias de biología molecular y celular, que incluyen, p. ej., subclonar el polinucleótido en un vector linealizado utilizando sitios de restricción apropiados y enzimas de restricción. Los polinucleótidos de la presente invención se amplifican por reacción en cadena de la polimerasa utilizando cebadores de oligonucleótidos complementarios a cada una de las cadenas del polinucleótido. Estos cebadores también incluyen sitios de escisión de enzimas de restricción para facilitar la subclonación en un vector. Los componentes del vector replicable incluyen generalmente, entre otros, uno o más de lo siguiente: una secuencia señal, un origen de replicación y uno o más marcadores o genes seleccionables.

Con el fin de expresar un polipéptido de la presente invención, las secuencias de nucleótidos que codifican el polipéptido, o equivalentes funcionales, se insertan en un vector de expresión apropiado, es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante de la inserción insertada. Métodos bien conocidos por los expertos en la técnica se utilizan para construir vectores de expresión que contienen secuencias que codifican un polipéptido de interés y elementos de control de la transcripción y la traducción apropiados. Estos métodos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. Técnicas de este tipo se describen, por ejemplo, en Sambrook, J., et al. (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y., y Ausubel, F.M. et al. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y.

Se utiliza una diversidad de sistemas de expresión vector/huésped para contener y expresar secuencias de polinucleótidos. Estos incluyen, pero no se limitan a microorganismos tales como bacterias transformadas con vectores de expresión de ADN recombinante de bacteriófagos, plásmidos o cósmidos recombinantes; levadura transformada con vectores de expresión de levadura; sistemas de células de insectos infectados con vectores de expresión de virus (p. ej., baculovirus); sistemas de células vegetales transformados con vectores de expresión de virus (p. ej., virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o con vectores de expresión bacterianos (p. ej., plásmidos Ti o pBR322); o sistemas de células animales.

Una diversidad de secuencias promotoras son conocidas para eucariotas y cualquier se utiliza de acuerdo con la presente invención. Virtualmente todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT ubicada aproximadamente 25 a 30 bases aguas arriba del sitio donde se inicia la transcripción. Otra secuencia encontrada 70 a 80 bases aguas arriba desde el inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT, en que N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucariotas hay una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola poli A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan adecuadamente en vectores de expresión eucariotas.

En los sistemas celulares de mamíferos, se prefieren generalmente promotores de genes de mamíferos o de virus de mamíferos. La expresión de polipéptidos de vectores en células huésped de mamíferos es controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos a partir de genomas de virus tales como virus de polio, virus de la viruela aviar, adenovirus (p. ej., Adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus (CMV), un retrovirus, virus de la hepatitis B y más preferiblemente el virus 40 del simio (SV40), de promotores de mamíferos heterólogos, p. ej., el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, y de promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células huésped. Si es necesario generar una línea celular que contenga múltiples copias de la secuencia que codifica un polipéptido, los vectores basados en SV40 o EBV pueden utilizarse ventajosamente con un marcador seleccionable apropiado. Un ejemplo de un vector de expresión adecuado es pcDNA-3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) que incluye un promotor del CMV.

Está disponible un cierto número de sistemas de expresión basados en virus para la expresión de polipéptidos en mamíferos. Por ejemplo, en los casos en que se utiliza un adenovirus como un vector de expresión, las secuencias que codifican un polipéptido de interés pueden ligarse en un complejo de transcripción/traducción de adenovirus que consiste en el promotor tardío y la secuencia conductora tripartita. La inserción en una región E1 o E3 no esencial del genoma viral puede utilizarse para obtener un virus viable que sea capaz de expresar el polipéptido en células huésped infectadas (Logan, J. y Shenk, T. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:3655-3659). Además, pueden utilizarse potenciadores de la transcripción, tales como el potenciador del virus del sarcoma de Rous (RSV), para aumentar la expresión en células huésped de mamíferos.

En sistemas bacterianos, cualquiera de un cierto número de vectores de expresión se selecciona dependiendo del uso previsto para el polipéptido expresado. Por ejemplo, cuando se desean grandes cantidades, se utilizan vectores que dirigen el alto nivel de expresión de proteínas de fusión que se purifican fácilmente. Estos vectores incluyen, pero no se limitan a, los vectores de clonación y expresión multifuncional en *E. coli* tales como BLUESCRIPT (Stratagene), en que la secuencia que codifica el polipéptido de interés puede ligarse al vector en marco con secuencias para el Met amino-terminal y los 7 residuos posteriores de  $\beta$ -galactosidasa, de modo que se produce una proteína híbrida; vectores pIN (Van Heeke, G. y S.M. Schuster (1989) *J. Biol. Chem.* 264:5503-5509); y similares. Los vectores pGEX (Promega, Madison, WI) también se utilizan para expresar polipéptidos extraños tales como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, estas proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente de las células lisadas mediante adsorción a perlas de glutatión-agarosa, seguido de elución en presencia de glutatión libre. Las proteínas preparadas en dichos sistemas están diseñadas para incluir sitios de escisión de heparina, trombina o proteasa de factor XA de modo que el polipéptido clonado de interés pueda liberarse del resto GST a voluntad.

En la levadura, *Saccharomyces cerevisiae*, se utiliza un cierto número de vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles tales como factor alfa, alcohol oxidasa y PGH. Ejemplos de otras secuencias promotoras adecuadas para uso con huéspedes de levadura incluyen los promotores para la 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glicolíticas, tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafofosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucoquinasa. Para revisiones, véase Ausubel *et al.* (*supra*) y Grant *et al.* (1987) *Methods Enzymol.* 153:516-544. Otros promotores de levadura que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de la transcripción controlada por condiciones de crecimiento incluyen las regiones del promotor de la alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradativas asociadas con el metabolismo del nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Vectores y promotores adecuados para su uso en la expresión de levaduras se describen adicionalmente en el documento EP 73.657. La expresión de proteínas de la superficie del HCV glicosiladas en levadura se describe en el documento WO 96/04385. Potenciadores de levadura también se utilizan ventajosamente con promotores de levadura.

En los casos en los que se utilizan vectores de expresión de plantas, la expresión de secuencias que codifican polipéptidos está dirigida por cualquiera de un cierto número de promotores. Por ejemplo, promotores virales, tales como los promotores 35S y 19S de CaMV se utilizan solos o en combinación con la secuencia conductora omega de TMV (Takamatsu, N. (1987) *EMBO J.* 6:307-311. Alternativamente, se utilizan promotores de plantas tales como la subunidad pequeña de RUBISCO o promotores de choque térmico (Coruzzi, G. et al. (1984) *EMBO J.* 3:1671-1680; Broglie, R. *et al.* (1984) *Science* 224:838-843; y Winter, J., *et al.* (1991) *Results Probl. Cell Differ.* 17:85-105). Estas construcciones pueden introducirse en células vegetales mediante transformación directa de ADN o transfección mediada por patógenos. Técnicas de este tipo se describen en un cierto número de revisiones disponibles (véase, p. ej., Hobbs, S. o Murry, L.E. en McGraw Hill Yearbook of Science and Technology (1992) McGraw Hill, Nueva York, N.Y.; págs. 191-196).

También se utiliza un sistema de insectos para expresar un polipéptido de interés. Por ejemplo, en uno de estos sistemas, el virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) se utiliza como un vector para expresar genes extraños en células de *Spodoptera frugiperda* o en larvas de *Trichoplusia*. Las secuencias que codifican el polipéptido se clonan en una región no esencial del virus, tal como el gen polihedrina, y se colocan bajo el control del promotor de la polihedrina. La inserción exitosa de la secuencia que codifica el polipéptido hace que el gen polihedrina esté inactivo y produce virus recombinantes que carecen de proteína de recubrimiento. Los virus recombinantes se utilizan luego para infectar, por ejemplo, células de *S. frugiperda* o larvas de *Trichoplusia*, en las que se expresa el polipéptido de interés (Engelhard, E.K. et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:3224-3227).

La desglicosilación parcial de las glicoproteínas de la superficie recombinantes se puede lograr mediante el uso controlado de combinaciones de diversas glicosidasas, tales como el tratamiento con neuraminidasa para separar el ácido siálico, con alfa-1-manosidasa (Sigma) para escindir residuos de manosa externos, o con endo F-N glicanasa ((Boehringer Mannheim Biochemicals, Mannheim, Alemania), que escinde eficientemente tanto los glicanos complejos como el alto contenido en manosa enlazado a N.

Los péptidos HA de la presente invención también pueden ser sintetizados por procedimientos que incorporan métodos comúnmente utilizados en la síntesis de péptidos tales como acoplamiento en solución clásica de residuos de aminoácidos y/o fragmentos de péptidos y, si se desea, técnicas de fase sólida. Puede utilizarse cualquier método para la síntesis de péptidos bien conocido en la técnica, por ejemplo, Schroeder y Lubke, en "The Peptides", Vol. 1, Academic Press, Nueva York, N.Y., págs. 2-128 (1965); "The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology", (E. Gross et al., Eds.), Academic Press, Nueva York, N.Y., Vol. 1-8 (1979-1987); Stewart y Young, en "Solid Phase Peptide Synthesis", 2ª ed., Pierce Chem. Co., Rockford, Ill. (1984); Wild et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 10537

(1992); y Rimsky et al., J Virol, 72: 986 (1998); Chan y White en "Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach", Oxford University Press, (2000). En algunas realizaciones, los glicopéptidos se pueden sintetizar utilizando aminoácidos glicosilados de modo que aminoácidos glicosilados, tales como GlcNAc-Asn (V-Labs, Covington, LA), se incorporan en los sitios de glicosilación apropiados del péptido.

5 Vacunas de la presente descripción pueden emplearse como un agente antiviral administrando el péptido por vía tópica, intranasal o a través de administración parenteral, tal como a través de inyección subcutánea, inyección intramuscular, inyección intravenosa, inyección intraperitoneal o inyección intradérmica, a un animal de sangre caliente, p. ej., seres humanos, caballos, otros mamíferos, etc. Los péptidos antivirales pueden utilizarse individualmente o en combinación. Adicionalmente, el péptido antiviral puede administrarse solo o como parte de  
10 una composición que comprende, además, uno o más soportes farmacéuticamente aceptables, cuya proporción está determinada por la solubilidad y la naturaleza química del péptido, la ruta de administración elegida y la administración biológica estándar. Debido a que los péptidos de la invención pueden fijar como objetivo proteínas en las superficies del virus y/o la célula, para garantizar la eficacia, el soporte en tales formulaciones debería estar libre o sustancialmente libre (p. ej., mejor que 90, 95, 98 o 99% en peso) de proteínas que se unen a los péptidos.

### 15 Composiciones Farmacéuticas

De acuerdo con otro aspecto, las vacunas y proteínas desglicosiladas de la presente divulgación pueden incluirse en una composición o formulación farmacéutica o nutracéutica junto con agentes activos adicionales, soportes, vehículos, adyuvantes, excipientes o agentes auxiliares identificables por una persona experta en la técnica al leer la presente divulgación.

20 Las vacunas de la presente divulgación comprenderán ventajosamente un péptido adyuvante en una cantidad adyuvante eficaz. Como resultará evidente para un experto en la técnica, la concentración óptima del péptido o péptidos adyuvantes dependerá necesariamente del o de los péptidos específicos utilizados, de las características del paciente, del inmunógeno utilizado y de la naturaleza de la infección viral para la cual se busca el tratamiento o la profilaxis. Los expertos en las técnicas médicas y farmacéuticas pueden determinar estos factores a la vista de la  
25 presente descripción. En general, los péptidos adyuvantes se administran más deseablemente a un nivel de concentración que generalmente proporcionará actividad adyuvante sin provocar efecto secundario perjudicial o nocivo alguno. Generalmente, se desea una cantidad eficaz de adyuvante. Una cantidad eficaz de adyuvante se refiere a una cantidad de un péptido adyuvante que es capaz de estimular una respuesta inmunitaria a un inmunógeno administrado.

30 Adyuvantes adecuados para su inclusión en composiciones de la presente divulgación incluyen aquellos que son bien conocidos en la técnica, tal como el adyuvante completo de Freund (CFA) que no se utiliza en seres humanos, adyuvante incompleto de Freund (IFA), escualeno, escualano, alumbre y diversos aceites, todos los cuales son bien conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente de varias fuentes, tales como Novartis (p. ej., adyuvante MF59).

35 Las composiciones farmacéuticas o nutracéuticas comprenden preferiblemente al menos un soporte farmacéuticamente aceptable. En composiciones farmacéuticas de este tipo, la vacuna o proteína desglicosilada forma el "compuesto activo", al que también se alude como "agente activo". Tal como se utiliza en esta memoria, el lenguaje "soporte farmacéuticamente aceptable" incluye disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares, compatibles con la  
40 administración farmacéutica. Compuestos activos suplementarios también se pueden incorporar en las composiciones. Una composición farmacéutica está formulada para que sea compatible con su vía de administración prevista. Ejemplos de vías de administración incluyen la administración parenteral, p. ej., intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (p. ej., por inhalación), transdérmica (tópica), transmucosa y rectal. Soluciones o suspensiones utilizadas para la aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un  
45 diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerol, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos, tales como alcohol bencílico o metil parabenos; antioxidantes, tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes, tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones, tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad, tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La  
50 preparación parenteral puede incluirse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples de vidrio o plástico.

Vehículos farmacéuticamente aceptables, adecuados para las composiciones que contienen los péptidos, se describen en los textos farmacéuticos estándar. Véase, p. ej., "Remington's Pharmaceutical Sciences", 18ª Ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1990). Ejemplos específicos no limitantes de soportes farmacéuticamente

aceptables adecuados incluyen agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol o similares y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, la composición puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tampón del pH que potencian la efectividad antiviral de la composición.

5 Sujeto, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a seres humanos y primates no humanos (p. ej., guerilla, macaco, tití), animales de ganado (p. ej., ovejas, vacas, caballos, burros y cerdos), animales de compañía (p. ej. perros y gatos), animales de ensayo de laboratorio (p. ej., ratón, conejo, rata, conejillo de indias, hámster), animales salvajes cautivos (p. ej., zorro, ciervo) y cualquier otro organismo que pueda beneficiarse de los agentes de la presente divulgación. No existe limitación sobre el tipo de animal que podría beneficiarse de los agentes descritos  
10 actualmente. Un sujeto, independientemente de si es un organismo humano o no humano, puede ser denominado paciente, individuo, animal, huésped o receptor.

Para la administración parenteral, los péptidos de la presente divulgación o vacunas de los mismos pueden administrarse por las composiciones por vía intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intradérmica, solos o en composiciones que comprenden, además, soportes farmacéuticamente aceptados. Para la administración  
15 por inyección se prefiere utilizar el péptido antiviral en una solución en un vehículo acuoso estéril que también puede contener otros solutos tales como tampones o conservantes, así como cantidades suficientes de sales farmacéuticamente aceptables o de glucosa para hacer que la solución sea isotónica. Los péptidos antivirales de la presente divulgación se pueden obtener en forma de sales terapéuticamente aceptables que son bien conocidas en la técnica.

20 Composiciones farmacéuticas adecuadas para un uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, soportes adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil administración a  
25 través de jeringa. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y preservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El soporte puede ser un disolvente o medio de dispersión que lo contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos.

La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de  
30 tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede lograr mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede  
35 lograrse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Soluciones inyectables estériles se pueden preparar mediante la incorporación de la composición activa en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes arriba enumerados, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando  
40 el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación incluyen secado al vacío y liofilización, que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente filtrada estéril del mismo.

45 Vacunas también se pueden administrar por vía oral. Composiciones orales incluyen generalmente un diluyente inerte o un soporte comestible. Para el propósito de la administración terapéutica oral, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes y utilizarse en forma de tabletas, pastillas o cápsulas, p. ej., cápsulas de gelatina. Las composiciones orales también se pueden preparar utilizando un soporte fluido para usar como colutorio. Se pueden incluir agentes aglutinantes farmacéuticamente compatibles o materiales adyuvantes como parte de la composición.  
50 Las tabletas, píldoras, cápsulas, pastillas y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante, tal como celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina; un excipiente, tal como almidón o lactosa, un agente desintegrante, tal como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un deslizante, tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante, tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante, tal como menta piperita, salicilato de metilo o aroma de naranja.  
55

Debido a que los péptidos y las vacunas de la presente divulgación han mostrado actividad contra virus respiratorios, también pueden administrarse localmente al sistema respiratorio, por ejemplo a la nariz, las cavidades sinusales, las membranas sinusales o los pulmones. El o los péptidos, las vacunas o las composiciones farmacéuticas que contienen uno o más péptidos o vacunas, pueden suministrarse al sistema respiratorio de cualquier manera adecuada, tal como por inhalación por vía oral o intranasal. Las presentes composiciones se pueden dispensar como un aerosol nasal en polvo o líquido, suspensión, gotas nasales, un gel o ungüento, a través de un tubo o catéter, mediante una jeringa, un paquete, una compresa o mediante una infusión en la submucosa. Los péptidos o las vacunas pueden suministrarse convenientemente en forma de aerosol utilizando un paquete presurizado o un nebulizador y un propulsor adecuado, p. ej., sin limitación, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede controlarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para uso en un inhalador o insuflador pueden formularse conteniendo una mezcla en polvo del péptido y una base en polvo adecuada, tal como lactosa o almidón. Se pueden encontrar ejemplos de formulaciones intranasales y métodos de administración en las publicaciones PCT WO 01/41782, WO 00/33813 y las patentes de EE.UU. N<sup>o</sup>s. 6.180.603; 6.313.093; y 5.624.898. Las patentes de EE.UU. citadas más adelante se incorporan aquí como referencia y para todos los fines. Un propelente para una formulación en aerosol puede incluir aire comprimido, nitrógeno, dióxido de carbono o un disolvente de bajo punto de ebullición basado en hidrocarburos. Los péptidos o vacunas de la presente divulgación pueden administrarse convenientemente en forma de una presentación en aerosol de un nebulizador o similar. En algunos aspectos, los ingredientes activos se micronizan adecuadamente para permitir la inhalación de sustancialmente todos los ingredientes activos en los pulmones tras la administración de la formulación de polvo seco, por lo que los ingredientes activos tendrán un tamaño de partícula de menos de 100 micras, deseablemente de menos de 20 micras, y preferiblemente en el intervalo de 1 a 10 micras. En una realización, uno o más de los péptidos o vacunas se empaquetan en un dispositivo que puede suministrar una cantidad predeterminada y generalmente efectiva del péptido por inhalación, por ejemplo un aerosol nasal o un inhalador.

La administración sistémica también puede ser por vía transmucosal o transdérmica. Para la administración por vía transmucosal o transdérmica se utilizan penetrantes apropiados para la barrera a atravesar en la formulación. Penetrantes de este tipo son generalmente conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosal, detergentes, sales biliares y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosal se puede lograr mediante el uso de aerosoles nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en ungüentos, pomadas, geles o cremas tal como se conoce generalmente en la técnica. Los compuestos también se pueden preparar en forma de supositorios (p. ej., con bases de supositorios convencionales, tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para el suministro rectal.

De acuerdo con las implementaciones, los compuestos activos se preparan con soportes que protegerán el compuesto frente a la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como acetato de etileno y vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Métodos para la preparación de tales formulaciones resultarán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales también se pueden obtener comercialmente de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Suspensiones liposomales (incluidos los liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales a antígenos específicos de células) también se pueden utilizar como soportes farmacéuticamente aceptables. Estos pueden prepararse de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, tal como se describe en la patente de EE.UU. N<sup>o</sup> 4.522.811.

Es ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma de unidad de dosificación para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma de unidad de dosificación, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto a tratar; conteniendo cada una de las unidades una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el soporte farmacéutico requerido.

Los expertos en la técnica apreciarán que la referencia en esta memoria al tratamiento se extiende a la profilaxis, así como al tratamiento de infecciones o síntomas establecidos. Los péptidos y las vacunas de la presente divulgación pueden administrarse terapéutica o profilácticamente. El tratamiento comienza preferiblemente antes o en el momento de la infección o en el momento en que el mamífero está expuesto a un virus que es capaz de provocar una infección viral respiratoria, y se continúa hasta que el virus ya no esté presente o sea activo en el tracto respiratorio. Sin embargo, el tratamiento también puede comenzarse después de la infección, después de que el mamífero haya estado expuesto a un virus que es capaz de provocar una infección respiratoria viral, o después de la aparición de síntomas establecidos de infección.

Se apreciará, además, que la cantidad de un péptido antiviral de la presente divulgación que es útil en el tratamiento o la prevención de la gripe variará no solo con el péptido particular seleccionado, sino también con la ruta de administración, la naturaleza de la afección que está siendo tratada y la edad y condición del paciente, y en última instancia quedará a discreción del médico o veterinario asistente. Sin embargo, en general, una dosis adecuada estará en el intervalo de aproximadamente 0,01 a 750 mg/kg de peso corporal por día, preferiblemente en el intervalo de 0,1 a 100 mg/kg/día, lo más preferiblemente en el intervalo de 0,5 a 25 mg/kg/día.

El péptido o la vacuna puede administrarse convenientemente en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, que contiene de 10 a 1500 mg, convenientemente 20 a 1000 mg, lo más convenientemente 50 a 700 mg de ingrediente activo por forma de dosificación unitaria, p. ej. 1 mg/kg equivale a 75 mg/75 kg de peso corporal.

Preferiblemente, la concentración de inmunógeno para cada una de las cepas del virus de la gripe para su inclusión en la vacuna es una cantidad que induce una respuesta inmunitaria sin efectos secundarios adversos significativos. Dicha cantidad variará dependiendo de qué inmunógeno se utilice y del tipo y la cantidad de péptido adyuvante incluido en la vacuna. Típicamente, una vacuna comprenderá inmunógeno en una cantidad de aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 µg por ml, más preferiblemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 300 µg por ml y lo más preferiblemente de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 15 µg por ml, medido por un ensayo SRD. Después de una vacunación inicial, los sujetos que se vacunan pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo adecuadamente espaciadas a partir de entonces.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de composiciones de este tipo pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándares en cultivos celulares o animales experimentales, p. ej., para determinar la DL<sub>50</sub> (la dosis letal para el 50% de la población) y la DE<sub>50</sub> (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la relación DL<sub>50</sub>/DE<sub>50</sub>. Se prefieren los compuestos que exhiben altos índices terapéuticos. Si bien se pueden utilizar compuestos que exhiben efectos secundarios tóxicos, se debe tener cuidado al diseñar un sistema de suministro que dirija este tipo de compuestos al sitio de la ubicación afectada para minimizar el daño potencial a las células no infectadas y, por lo tanto, reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y estudios con animales pueden utilizarse para formular un intervalo de dosificación para uso en seres humanos. La dosificación de este tipo de compuestos se encuentra preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluye la DE<sub>50</sub> con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto utilizado en el método de la divulgación, la dosis terapéuticamente efectiva se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentraciones en plasma circulante que incluya la CI<sub>50</sub> (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que logra una inhibición de síntomas medio máxima) tal como se determina en el cultivo celular. Dicha información se puede utilizar para determinar con mayor precisión dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta resolución.

Tal como se define en esta memoria, una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto activo (es decir, una dosificación efectiva) puede variar de aproximadamente 0,001 a 100 g/kg de peso corporal, u otros intervalos que serían evidentes y entendidos por los expertos sin una experimentación excesiva. El experto en la materia apreciará que determinados factores pueden influir en la dosis y el tiempo requeridos para tratar eficazmente a un sujeto, que incluyen, pero no se limitan a la gravedad de la enfermedad o trastorno, tratamientos previos, la salud general o la edad del sujeto y otras enfermedades presentes.

## EJEMPLOS

Sin intención de limitar el alcance de la invención, a continuación se dan ejemplos de instrumentos, aparatos, métodos y sus resultados relacionados de acuerdo con las realizaciones de la presente invención. Téngase en cuenta que los títulos o subtítulos pueden utilizarse en los ejemplos por conveniencia de un lector, lo que de ninguna manera debería limitar el alcance de la invención. Además, se proponen y divulgan en esta memoria determinadas teorías; sin embargo, de ninguna manera, ya sean correctas o incorrectas, deberían limitar el alcance de la invención siempre que la invención se practique de acuerdo con la invención sin tener en cuenta ninguna teoría o esquema de acción particular.

### Ejemplo 1: Construcción génica para la expresión de HA

La secuencia de la HA H5N1 de la gripe era la de H5 consenso, CHA5 (Chen MW, et al. (2008) Proc Natl Acad Sci USA 105:13538-13543). Los codones de CHA5 se optimizaron para la expresión utilizando codones humanos. El

sitio original de escisión de la proteasa viral PQRERRRKKRG fue mutado a PQRERG para evitar que las proteínas de la escisión enzimática formaran HA I y HA2. La región de la transmembrana (residuos: 533-555) se sustituyó con los residuos adicionales (*LVPRGSPGSGYIPEAPRDGOAYVRKDGWVLLSTFLG HHHHHH*) en el extremo C de la construcción de HA, en que el sitio de escisión de trombina está en cursiva, la secuencia de trimerización de foldon de la fibrina del bacteriófago T4 está subrayada, y la etiqueta His está en negrita (Stevens J. et al. (2006) Science 312: 404-410). La secuencia de HA modificada se clonó en el vector pTT para la expresión de proteínas (Durocher Y, et al. (2002) Nucleic Acids Res 30: E9).

#### Ejemplo 2: Expresión y purificación de proteínas.

El plásmido que codifica la HA secretada se transfectó en las líneas celulares de riñón embrionario humano de cualquiera de HEK293EBNA (ATCC número CRL-10852) o las células GnTI- HEK293S (Reeves PJ, et al. (2002) Proc Natl Acad Sci USA 99:13419-13424) utilizando polietilenimina y se cultivó en medio de expresión Freestyle 293 (Invitrogen, Carlsbad, CA) complementado con suero de ternera bovino al 0,5%. El sobrenadante se recogió 72 h después de la transfección y se eliminó por centrifugación. Las proteínas HA se purificaron con cromatografía de quelación de níquel tal como se describió previamente (Wei CJ, et al. (2008) J Virol 82:6200-6208) para obtener HA<sub>lg</sub> totalmente glicosilada y HA<sub>hm</sub> de alto contenido en manosa. Para obtener la proteína HA sin sialilación - la HA<sub>ds</sub> desialilada - la proteína purificada se trató con neuraminidasa de *Clostridium* 20 mM (NA; Sigma) durante 2 h a 37 °C. Después del tratamiento con NA, la proteína se purificó nuevamente para separarse de la NA. La HA<sub>hm</sub> purificada se trató con Endo H (NEB) durante 2 h a 37 °C para producir proteína HA con una GlcNAc única en los sitios de glicosilación, la HA<sub>mg</sub> monoglicosilada. Todas las proteínas HA purificadas se analizaron con SDS PAGE, matriz de glicano y espectrometría de masas (MS).

#### Ejemplo 3: Liberación de N-glicanos a partir de glicoproteínas para análisis de MS.

Las glicoproteínas HA purificadas se redujeron con ditioneitol 10 mM (DTT, Sigma) a 37°C durante 1 hora. A continuación, una muestra reducida se alquiló por yodoacetamida 50 mM (IAA, Merck) en la oscuridad durante 1 hora y luego fue desalada mediante doble destilación (ddH<sub>2</sub>O) y se secó en un vacío de velocidad. Los extractos de proteína HA reducidos y alquilados se digirieron primero con tripsina (Roche) en una relación aproximada de enzima a proteína a 1:20 (p/p) en tampón de bicarbonato de amonio 50 mM, pH 8,3 a 37°C durante 4 h, seguido de digestión secundaria con tripsina (Roche), y luego se cargó en el cartucho C18 Sep-Pak de fase inversa (Waters Corp). La muestra se incubó además con N-glucosidasa F (Roche) en bicarbonato de amonio 50 mM pH 8,3 a 37°C durante 16 h, y con dos incubaciones más de N-glucosidasa F. Los N-glicanos liberados se separaron de los péptidos/glicopéptidos mediante un procedimiento de cartucho C-18 Sep-Pak con N-glicanos recogidos en ácido acético (AcOH) al 5%, la fracción de flujo continuo. Los péptidos se eluyeron en 20%, 40% y 60% de 1-propanol con 5% de AcOH.

#### Ejemplo 4: Análisis MALDI-MS y MS/MS.

Todas las muestras de glicano se permitilaron utilizando el método de suspensión de NaOH/dimetilsulfóxido. La suspensión de NaOH/DMSO se mezcló con muestras de glicano secas en un tubo de vidrio con tapa de rosca y se añadieron 300 µL de yodometano (Merck) al tubo, y el tubo se agitó suavemente durante 25 min. La reacción se terminó añadiendo ~ 1 ml de ddH<sub>2</sub>O gota a gota, y luego se añadió un volumen igual de cloroformo. Los glicanos permitilados se extrajeron en la capa orgánica inferior y se separaron NaOH adicional así como otros contaminantes hidrófilos mediante extracción repetida con ddH<sub>2</sub>O. El cloroformo se evaporó con gas nitrógeno. Para el perfilado de glicanos, los glicanos permitilados en acetonitrilo se mezclaron 1:1 con 10 mg/ml de ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB) en acetonitrilo al 50%, se detectaron en placa diana calentada y se recrystalizaron en placa con acetonitrilo. La adquisición de datos se realizó en el analizador ABI 4700Proteomics (Applied Biosystems) hecho funcionar en modo reflectron. Se acumularon disparos con láser (5 Hz; 10 disparos por espectro) hasta que se logró una relación señal/ruido satisfactoria cuando se combinaron y suavizaron. En el instrumento TOF/TOF, los datos de CID MS/MS de alta energía se adquirieron manualmente y típicamente comprendían un total de 40 sub-espectros de 125 disparos láser en un ajuste de energía láser de 5000-5500.

#### Ejemplo 5: Fabricación de micromatrices de glicanos.

Veinticuatro glicanos que contenían ácido siálico, diseñados para HA, se prepararon químicamente y se utilizaron para la fabricación de matrices. Se imprimieron micromatrices (BioDot; Cartesian Technologies) mediante deposición por pin robótico (SMP3; TeleChem International) de ~ 0,7 nL de diversas concentraciones de glicanos que contienen amina en el tampón de impresión (tampón fosfato 300 mM, pH 8,5, que contiene Tween 20 al 0,005%) una placa de 384 pocillos sobre portaobjetos de vidrio recubiertos con NHS (portaobjetos Nexterion H; SCHOTT North America). Los portaobjetos para sialósidos se detectaron con soluciones de glicanos 1-17 y 21-27 con concentraciones de 100 µM en cada fila para un glicano de abajo hacia arriba, con 12 réplicas colocadas horizontalmente en cada uno de los

subcampos, y cada uno de los portaobjetos se diseñó para 16 cuadrículas. para futuros experimentos de incubación. Los portaobjetos impresos se dejaron reaccionar en una atmósfera de 80% de humedad durante una hora, seguido de desecación durante la noche, y se almacenaron a temperatura ambiente en un desecador hasta su uso. Antes del ensayo de unión, estos portaobjetos se bloquearon con etanolamina (etanolamina 50 mM en tampón borato, pH 9,2) y luego se lavaron con agua y tampón PBS, pH 7,4, dos veces.

**Ejemplo 6:** Marcaje de hemaglutinina con Éster Cy3-NHS.

Cada una de las muestras de proteína HA se diluyó con PBS (pH = 7,4) hasta la concentración final de 1 mg/ml, y luego se marcó con Éster Cy3Mono NHS (5  $\mu$ L, 0,2 mg/ml) (GE Healthcare, Reino Unido). Después de que las reacciones hubieran transcurrido durante 18 h en hielo, se añadieron 20  $\mu$ L de glicina 500 mM en PBS a cada uno de los tubos para enfriar bruscamente las reacciones. Luego, las soluciones se incubaron en hielo durante 30 min adicionales. Las moléculas de colorante no reactivas se separaron haciendo pasar cada una de las soluciones a través de un filtro giratorio de exclusión por tamaño (Microcon YM-30, Millipore, EE.UU.) con un límite de peso molecular de 30 kDa. Con el fin de obtener la relación de colorante/proteína, cada una de las muestras de proteína marcada se diluyó con PBS para las mediciones de absorbancia dual a 280 nm (para proteína) y a 552 nm (para Cy3; el coeficiente de extinción molar es  $150,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a esta longitud de onda) utilizando el espectrofotómetro NanoDrop ND-100 (NanoDrop Technologies, EE.UU.). Después de corregir el cálculo de la absorbancia de CyDye a 280 nm (aproximadamente el 8% de la absorbancia a 552 nm), las relaciones de colorante/proteína se generaron a partir de los resultados de las mediciones de absorbancia dual.

**Ejemplo 7:** Ensayo de Unión Indirecta.

Variantes glicosiladas de HA se prepararon en Tween 20 al 0,005%/PBS, pH 7,4, y se añaden para cubrir la red en la matriz de glicano con la aplicación de un cubreobjetos. Después de la incubación en una cámara humidificada con agitación durante 1 h, los portaobjetos se lavaron tres veces con tampón Tween 20 al 0,005%/PBS, pH 7,4. A continuación, se añadió anticuerpo HA de conejo anti-H5N1 a los portaobjetos y se incubó en una cámara humidificada durante 1 h. Después de lavar los portaobjetos con tampón Tween 20 al 0,005%/PBS tres veces, se añadió el anticuerpo IgG anti-conejo de cabra conjugado con Cy3 a los portaobjetos y se incubó en una cámara humidificada durante otra 1 h. Los portaobjetos se lavaron tres veces con tampón Tween 20 al 0,05%/PBS, pH 7,4; tres veces con tampón PBS, pH 7,4; y tres veces con H<sub>2</sub>O, y luego se seca. Los portaobjetos se escanearon a 595 nm (para Cy3) con un lector de chips de fluorescencia de micromatrices (GenePix Pro 6.0; Molecular Devices).

**Ejemplo 8:** Ensayo de Unión Directa.

Las proteínas HA marcadas con Cy3 con diferente glicosilación se prepararon en tampón Tween 20 al 0,005%/PBS (pH 7,4) y se añadieron para cubrir la rejilla en la matriz de glicano con la aplicación de un cubreobjetos. Después de la incubación en una cámara de humidificación con agitación durante 1 h, los portaobjetos se lavaron tres veces con tampón Tween 20 al 0,005%/PBS (pH 7,4), tres veces con tampón PBS (pH 7,4) y tres veces con H<sub>2</sub>O y se secaron. El portaobjetos se escaneó a 595 nm (para Cy3) con un lector de chips de fluorescencia de micromatrices (GenePix Pro 6.0, Molecular Devices, EE.UU.).

**Ejemplo 9:** Ensayo de Microneutralización.

El virus H5N1 recién preparado (NIBRG-14) (National Institute for Biological Standards and Control, Potters Bar, Reino Unido) se cuantificó con la dosis infecciosa mediana de cultivo de tejidos (TCID<sub>50</sub>). La TCID<sub>50</sub> de 100 veces de virus se mezcló en igual volumen con diluciones en serie de 2 veces de solución patrón de suero en placas de 96 pocillos y se incubó durante 1 h a 37 °C. La mezcla se añadió a las células MDCK ( $1,5 \times 10^4$  células por pocillo) en las placas, seguido de incubación a 37 °C durante 16-20 h. Las células se lavaron con PBS, se fijaron en solución de acetona/metanol (vol/vol 1:1) y se bloquearon con leche descremada al 5%. El antígeno viral se detectó por ELISA indirecto con un mAb contra la gripe A NP (Sui JH, et al. (2009) Nat Struct Mol Biol 16:265-273).

**Ejemplo 10:** Ratones. Vacunación y Enfrentamiento.

Ratones BALB/c hembras de 6 a 8 semanas de edad (n = 15) fueron inmunizados por vía intramuscular con 20  $\mu$ g de proteínas HA<sub>ig</sub> o HA<sub>mg</sub> purificada en 50  $\mu$ L de PBS, pH 7,4, y se mezcló con 50  $\mu$ L de 1 mg/mL de hidróxido de aluminio (Alum; Sigma) en las semanas 0 y 2. Se recogió sangre 14 días después de la inmunización, y se recogieron muestras de suero de cada uno de los ratones. Los ratones inmunizados se enfrentaron por vía intranasal a un virus H5N1 modificado genéticamente, NIBRG-14, con una dosis letal (dosis letal 100 veces mayor a 50% de los ratones). Los ratones fueron vigilados diariamente durante 14 días después del enfrentamiento en cuanto a la supervivencia. Todos los experimentos con animales fueron evaluados y aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Academia Sinica.

**Ejemplo 11: Ensayo de hemaglutinación (HA)**

La hemaglutinación de glóbulos rojos de pollo (cRBCs, Lampire Biological Laboratories, Pipersville, Pensilvania) se lleva a cabo en placas de microtitulación de fondo redondo de 96 pocillos preparando diluciones dobles de muestras virales en PBS, tal como se describe en Jones, et al., Journal of Virology, 80(24):11960-11967 (2006). El título se informa como unidades de hemaglutinación por 50  $\mu\text{L}$  (HAU/50  $\mu\text{L}$ ) de muestra.

**Ejemplo 12: Purificación de hemaglutinina viral:**

La hemaglutinina asociada a Viron (HA) se purificó a partir de partículas del virus de la gripe tal como se describe en Johansson, et al., Journal of Virology, 1989, vol. 63(3), pág. 1239-1246, con modificaciones. Brevemente, el virus se recoge del fluido alantoideo de huevos de gallina infectados y la sacarosa se purifica como se describió arriba. Los sedimentos se resuspenden en 0,5 mL de tampón acetato de sodio (acetato de sodio 0,05 M,  $\text{CaCl}_2$  2 mM, EDTA 0,2 mM, pH a 7,0), se homogenizan a través de una aguja de calibre 18 y se mezclan con un volumen igual del 15% de octilglucósido (octil- $\beta$ -D-tioglucoído; Fisher Scientific, Norcross, Ga) en tampón acetato de sodio, seguido de agitación vigorosa durante 5 minutos. Esta suspensión se centrifuga a 18.400 xg durante 60 minutos a 4°C, y el sobrenadante se retira cuidadosamente y se reserva como la fracción rica en HA. Se añade bromuro de cetil trimetil-amonio acuoso al dos por ciento (CTAB, Bio-World, Dublin, Ohio) a la fracción de HA a una concentración final de CTAB al 0,1%, y la muestra se aplica a una columna DEAE-Sephadex (A-50; GE Healthcare, Uppsala, Suecia) de intercambio iónico (lecho, 0,7 cm x 6,0 cm) previamente expandida y equilibrada con Tris-HCl 0,05 M (pH 7,5) que contiene 0,1% de octilglucósido. Se recogieron veinte fracciones de 0,5 mL por gravedad con tampón de elución de HA con bajo contenido de sal (TrisHCl 0,05 M, NaCl 0,1 M, Triton X-100 al 0,1%, pH a 7,5) y nuevamente con un tampón de elución de HA con alto contenido de sal (TrisHCl 0,05 M, NaCl 0,2 M, Triton X-100 al 0,1%, pH a 7,5). Las fracciones individuales se ensayan para determinar la actividad de HA y se analiza su pureza mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida en condiciones no reductoras, seguido de tinción con Comassie coloidal. La concentración de proteína se determina mediante un ensayo BCA según las instrucciones del fabricante (Pierce, Rockford, Ill.).

**Ejemplo 13: Análisis de Datos de la Matriz.**

El software GenePix Pro (Axon Instruments) se utilizó para el análisis de fluorescencia de los datos extraídos. El fondo local fue sustraído de la señal en cada punto. Los puntos con defectos obvios, sin señal detectable o con una fluorescencia neta de <100 se eliminaron del análisis. Las "medianas de relaciones" de los puntos replicados se promediaron en la misma matriz. El perfil de la unión de HA a la matriz (Fig. 2A) y la determinación de la constante de asociación (Fig. 2B) se realizaron bajo las mismas condiciones en la misma matriz para asegurar que los datos se normalizaron.

Para determinar el valor  $K_{D, \text{surf}}$ , los datos de unión de equilibrio se analizaron ajustando los datos a las isothermas de Langmuir (ecuación 1), suponiendo que los ligandos se unieran a uno o dos sitios independientes, utilizando el programa comercial de regresión no lineal GraphPad PRISM (Graph-Pad).

$F_{\text{máx}}$  es la intensidad de fluorescencia máxima, una medida de la cantidad de hidratos de carbono activo en la superficie; (P) es la concentración total de proteínas HA y  $K_{D, \text{surf}}$  es la constante de disociación de equilibrio entre los hidratos de carbono de la superficie y las proteínas.

Los valores de  $K_{D, \text{surf}}$  de cada una de las muestras se repitieron y calcularon al menos 4 veces para obtener la media de  $K_{D, \text{surf}}$ . Al utilizar los valores  $K_{D, \text{surf}}$ , los parámetros termodinámicos pueden derivarse de las ecuaciones (2) y (3).

$$F_{\text{obs}} = F_{\text{máx}}(P)/(K_{D, \text{surf}} + (P)) \quad \{\text{Ecuación 1}^\circ\}$$

$$K_{D, \text{surf}} = K_{A, \text{surf}}^{-1} \quad \{\text{Ecuación 2}^\circ\}$$

$$\Delta G_{\text{multi}} = RT \ln(K_{A, \text{surf}}) \quad \{\text{Ecuación 3}^\circ\}$$

$K_{A, \text{surf}}$  representa las constantes de asociación en la ecuación (1). En la ecuación (2),  $R = 1,987 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ; T es la temperatura absoluta, y los experimentos se realizaron a 298 K. Estos valores de cada una de las muestras se calcularon utilizando Microsoft Excel. El análisis estadístico de  $K_{D, \text{surf}}$  en diferentes glicofomas de HA se realizó con ANOVA de una vía utilizando GraphPad PRISM (GraphPad).

**Ejemplo 14: Determinación de Anticuerpos Específicos para HA en Suero mediante ELISA**

Las proteínas HA se purificaron de HEK293 y se revistieron en las placas de 96 pocillos (5 µg/mL) durante la noche. El suero de ratón se diluyó 100 veces para ser el suero de reserva para la medición de la unión de HA. Las placas revestidas con HA se incubaron con suero en diluciones en serie de 2 veces durante 1 h. Se detectó IgG específica para HA, utilizando anticuerpos anti-ratón conjugados con HRP. La dilución de punto final se calculó seleccionando la dilución para la cual la lectura estaba por encima de la dilución 1:50 de suero preinmune (Stevens J. et al. (2006) Science 312:404-410). El antisuero de conejo fue preparado por LTK BioLaboratories. El conejo fue inmunizado con aproximadamente 0,25-0,35 mg de proteínas HA mezcladas con adyuvantes completos o incompletos. Se recogió sangre del conejo después de seis inmunizaciones, con un programa de una inmunización cada 2 semanas.

#### **Ejemplo 15: Análisis del Sitio de Glicosilación para HA.**

Se recuperó un total de 297 secuencias de HA de longitud completa de los virus de la gripe H1, H3 y H5 de la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica y se alinearon mediante el programa ClustalW2 en EMBL-EBI (Larkin MA, et al. (2007) Bioinformatics 23:2947-2948). Las secuencias datan de los años 1918 a 2000 y fueron aisladas de seres humanos. Para reducir la redundancia, las cepas en un país solo se seleccionaron una vez para el análisis. Secuencias utilizadas para el alineamiento incluyen, H1 (AAX56530, AAY78939, ABA18037, ABB51962, ABC42750, ABD60867, ABD62061, ABE11690, ABF47869, ABF82830, ABF82852, ABG37362, ABI19015, ABI21211, ABI95294, ABI96103, ABK39995, ABK57092, ABK57093, ABK79970, ABO32948, ABO32970, ABR15885, ABS71664 y ABS76427); H3 (AAT08000, AAT12654, AAX11455, AAY58320, AAZ32943, AAZ43394, ABA26700, ABA26777, ABB51961, ABB71825, ABC42596, ABC42607, ABC42629, ABC43017, ABD15713, ABD59850, ABD61359, ABF17954, ABG37450 y ABG37461); H5 (AAS65618, AAT39065, AAT73273, AAT73274, AAT73275, AAT84153, AAV32636, ABC72655, ABD28180, ABD28182, ABE97624, ABI16504, ABI36144, ABI36439, ABO10181, ABO36644 y ABP51968). Las glicosilaciones enlazadas a N de las secuencias de HA se predijeron por el centro de los servidores de predicción de análisis de secuencia biológica (www.cbs.dtu.dk/services/). Para la glicosilación de asparagina (Asn), las secuencias contienen el patrón de aminoácidos Asn-X<sub>aa</sub>-(Ser/Thr), en que X<sub>aa</sub> puede ser cualquier aminoácido excepto prolina (Gavel Y, et al. (1990) Protein Eng 3:433-442), seguido de serina o treonina. Los resultados para el análisis de datos se prepararon utilizando el programa PRISM (GraphPad) y Jalview (Waterhouse AM, et al. (2009) Bioinformatics 25:1189-1191).

#### **Ejemplo 16: Método químico para la síntesis de glicopéptidos HA**

La síntesis escalonada de los glicopéptidos HA puede llevarse a cabo mediante el método del anhídrido mixto dimetilfosfotioico (Mpt-MA) (Inazu, T., et al. (1997) en Peptide Chemistry 1996 (Kitada, C. ed.) págs. 41-44, Protein Research Foundation, Osaka). Las glicoproteínas HA pueden sintetizarse por un método de tioéster con una secuencia consenso "Asn-X-Ser/Thr" para la N-glicosilación, pero sin cadenas de azúcar. El fragmento peptídico se prepara mediante un sintetizador automático utilizando un programa de estrategia Boc suministrado. La reacción de acoplamiento se realiza utilizando DCC/HOBt como reactivo activador. El residuo Asn(GlcNAc) se acopla mediante un método Mpt-MA utilizando Boc-Asn(GlcNAc)-OH (3 equiv). Las reacciones de acoplamiento se realizan durante 1 h y se repiten con monitorización. Después del tratamiento con HF anhidro que contiene 10% de anisol y purificación por HPLC, se obtiene un tioéster de glicopéptido. Este segmento de tioéster de glicopéptido se acopla con el otro segmento de péptido, que se preparó por separado mediante el método de condensación de segmento de tioéster. Después de las desprotecciones y la formación del enlace disulfuro, se obtiene el análogo GlcNAc-HA.

Alternativamente, puede llevarse a cabo un método convergente de síntesis de glicopéptidos HA mediante la reacción de acoplamiento del grupo β-carboxilo de peptidil Asn con glicosilamina. (Véase Cohen-Abisfeld, S.T., y Lansbury, P.T. (1993) J. Am. Chem. Soc. 115, 10531-10537).

#### **Ejemplo 17: Método quimioenzimático para la síntesis de glicopéptidos HA**

La preparación de un glicopéptido que contiene un oligosacárido complejo puede realizarse utilizando métodos enzimáticos junto con métodos químicos. La síntesis de N-glicopéptidos se puede realizar utilizando la actividad de transglicosilación de endo-β-N-acetilglucosaminidasa (endo-β-GlcNAc-asa). (Takegawa, K., et al. (1995) J. Biol. Chem. 270, 3094-3099). Endo-β-GlcNAc-asa hidroliza el enlace glicosídico entre el resto N,N'-diacetilquitobiosa de un oligosacárido unido a N, y transfiere el fragmento de oligosacárido liberado a un compuesto hidroxilo. La síntesis de N-glicopéptidos utilizando endo-β-GlcNAc-asa se puede realizar en dos etapas. Primero, un péptido que contiene GlcNAc se prepara por una ruta química. Luego, un fragmento de oligosacárido de un donante de glicosilo se transfiere al resto GlcNAc del glicopéptido como un aceptor de glicosilo mediante la reacción de transglicosilación de endo-β-GlcNAc-asa.

Aunque en esta memoria se han descrito realizaciones específicas de la invención con fines ilustrativos, se pueden realizar diversas modificaciones. Por consiguiente, la invención no está limitada excepto por las reivindicaciones adjuntas.



Pro Gln Arg Glu Arg Gly  
 1 5

- <210> 3
- <211> 43
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Sintética
- <400> 3

10 Leu Val Pro Arg Gly Ser Pro Gly Ser Gly Tyr Ile Pro Glu Ala Pro  
 1 5 10 15

Arg Asp Gly Gln Ala Tyr Val Arg Lys Asp Gly Glu Trp Val Leu Leu  
 20 25 30

Ser Thr Phe Leu Gly His His His His His His  
 35 40

- <210> 4
- <211> 564
- <212> PRT
- 15 <213> Virus de la gripe A
- <400> 4

ES 2 784 189 T3

Met Glu Lys Ile Val Leu Leu Phe Ala Ile Val Ser Leu Val Lys Ser  
 1 5 10 15

Asp Gln Ile Cys Ile Gly Ser His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val  
 20 25 30

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile  
 35 40 45

Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys  
 50 55 60

Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn  
 65 70 75 80

Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val  
 85 90 95

Glu Lys Ala Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Asn  
 100 105 110

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu  
 115 120 125

Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Ser His Glu Ala Ser  
 130 135 140

Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Gln Gly Lys Ser Ser Phe Phe  
 145 150 155 160

Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Ser Thr Tyr Pro Thr Ile  
 165 170 175

Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp  
 180 185 190

ES 2 784 189 T3

Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Lys Leu Tyr Gln  
 195 200 205

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

Leu Val Pro Lys Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly  
 225 230 235 240

Arg Met Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn  
 245 250 255

Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile  
 260 265 270

Val Lys Lys Gly Asp Ser Thr Ile Met Lys Ser Glu Leu Glu Tyr Gly  
 275 280 285

Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Met Gly Ala Ile Asn Ser Ser  
 290 295 300

Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys  
 305 310 315 320

Tyr Val Lys Ser Asn Arg Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser  
 325 330 335

Pro Gln Arg Glu Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu  
 340 345 350

Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His Ser  
 355 360 365

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

Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile Ile Asp Lys Met  
 385 390 395 400

Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe Asn Asn Leu Glu Arg  
 405 410 415

Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp Val  
 420 425 430

Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met Glu Asn Glu Arg Thr  
 435 440 445

ES 2 784 189 T3

Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Asp Lys Val Arg  
 450 455 460

Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly Asn Gly Cys Phe Glu  
 465 470 475 480

Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser Val Arg Asn Gly  
 485 490 495

Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala Arg Leu Lys Arg Glu  
 500 505 510

Glu Ile Ser Gly Val Asp Ile Arg Ser Leu Val Pro Arg Gly Ser Pro  
 515 520 525

Gly Ser Gly Tyr Ile Pro Glu Ala Pro Arg Asp Gly Gln Ala Tyr Val  
 530 535 540

Arg Lys Asp Gly Glu Trp Val Leu Leu Ser Thr Phe Leu Gly His His  
 545 550 555 560

His His His His

<210> 5

<211> 1695

<212> ADN

5 <213> Virus de la grippe A

<400> 5

```

atggagaaga tcgtgctgct gttcgccatc gtgagcctgg tgaagagcga ccagatctgc      60
atcggatccc acgccaacaa cagcaccgag cagggtggaca ccatcatgga gaagaacgtg      120
accgtgacct acgcccagga catcctggag aagaccacaca acggcaagct gtgcgacctg      180
gacggcgtga agcctctgat cctgagagac tgcagcgtgg ccggctggct gctgggcaac      240
cctatgtgcg acgagttcat caacgtgcct gagtggagct acatcgtgga gaaggccaac      300
cctgccaacg acctgtgcta ccctggcgac ttcaacgact acgaggagct gaagcacctg      360
ctgagcagaa tcaaccactt cgagaagatc cagatcatcc ctaagagcag ctggagcagc      420
cacgaggcca gcagcggcgt gagcagcgcc tgccettacc agggcaagag cagcttcttc      480
agaaacgtgg tgtggctgat caagaagaac agcacctacc ctaccatcaa gagaagetac      540
aacaacacca accaggagga cctgctggtg ctgtggggca tccaccacc taacgacgcc      600
gccgagcaga ccaagctgta ccagaaccct accacctaca tcagcgtggg caccagcacc      660
ctgaaccaga gactggtgcc taagatcgcc accagaagca aggtgaacgg ccagagcggc      720
agaatggagt tcttctggac catcctgaag cctaacgacg ccatcaactt cgagagcaac      780
    
```

ES 2 784 189 T3

ggcaacttca tcgcccctga gtacgcctac aagatcgtga agaagggcga cagcaccatc 840  
atgaagagcg agctggagta cggcaactgc aacaccaagt gccagacccc tatgggcgcc 900  
atcaacagca gcatgccttt ccacaacatc caccctctga ccatcggcga gtgccctaag 960  
tacgtgaaga gcaacagact ggtgctggcc accggcctga gaaacagccc tcagagagag 1020  
agaggcctgt tcggcgccat cgccggcttc atcgagggcg gctggcaggg catggtggac 1080  
ggctggtacg gctaccacca cagcaacgag cagggcagcg gctacgccgc cgacaaggag 1140  
agcaccacaga aggccatcga cggcgtgacc aacaaggtga acagcatcat cgacaagatg 1200  
aacacccagt tcgaggccgt gggcagagag ttcaacaacc tggagagaag aatcgagaac 1260  
ctgaacaaga agatggagga cggcttctctg gacgtgtgga cctacaacgc cgagctgctg 1320  
gtgctgatgg agaacgagag aacctggac ttccacgaca gcaacgtgaa gaacctgtac 1380  
gacaaggtga gactgcagct gagagacaac gccaaaggagc tgggcaacgg ctgcttcgag 1440  
ttctaccaca agtgcgacaa cgagtgcattg gagagcgtga gaaacggcac ctacgactac 1500  
cctcagtaca gcgaggaggc cagactgaag agagaggaga tcagcggcgt ggatatcaga 1560  
tctctggtgc caagaggatc tccaggatct ggatacatcc cagaggctcc aagagatgga 1620  
caagcttacg tgagaaagga cggagagtgg gtgctgctgt ctactttcct gggacaccac 1680  
caccaccacc actaa 1695

<210> 6  
<211> 567  
5 <212> PRT  
<213> Virus de la gripe A

<400> 6

Met Lys Ala Ile Leu Val Val Leu Leu Tyr Thr Phe Ala Thr Ala Asn  
1 5 10 15

Ala Asp Thr Leu Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr  
20 25 30

Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn  
35 40 45

Leu Leu Glu Asp Lys His Asn Gly Lys Leu Cys Lys Leu Arg Gly Val  
50 55 60

Ala Pro Leu His Leu Gly Lys Cys Asn Ile Ala Gly Trp Ile Leu Gly  
65 70 75 80

Asn Pro Glu Cys Glu Ser Leu Ser Thr Ala Ser Ser Trp Ser Tyr Ile  
85 90 95

Val Glu Thr Pro Ser Ser Asp Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Asp Phe



ES 2 784 189 T3

His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Leu Lys Ser  
370 375 380

Thr Gln Asn Ala Ile Asp Glu Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile  
385 390 395 400

Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn His  
405 410 415

Leu Glu Lys Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe  
420 425 430

Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn  
435 440 445

Glu Arg Thr Leu Asp Tyr His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu  
450 455 460

Lys Val Arg Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly  
465 470 475 480

Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Thr Cys Met Glu Ser Val  
485 490 495

Lys Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ala Lys Leu  
500 505 510

Asn Arg Glu Glu Ile Asp Gly Val Asp Ile Arg Ser Leu Val Pro Arg  
515 520 525

Gly Ser Pro Gly Ser Gly Tyr Ile Pro Glu Ala Pro Arg Asp Gly Gln  
530 535 540

Ala Tyr Val Arg Lys Asp Gly Glu Trp Val Leu Leu Ser Thr Phe Leu  
545 550 555 560

Gly His His His His His His  
565

<210> 7

<211> 1720

5 <212> ADN

<213> Virus de la gripe A

<400> 7

atggcgcgcc gctagcatga aggccatcct ggttgctgctg ctgtacacct tcgctaccgc 60

caacgccgat accctgtgca tcggctacca cgccaacaac agcaccgaca ccgtggatac 120

cgtgctggaa aagaacgtga ccgtgaccca cagcgtgaac ctgctggaag ataagcacia 180

ES 2 784 189 T3

cggcaagctg tgcaagctga gaggcgtggc ccctctgcac ctgggcaagt gcaatatcgc 240  
 cggctggatc ctgggcaacc ccgagtgcga gagcctgagc accgccagca gctggtccta 300  
 catcgtggag acaccagca gcgacaatgg cacctgttac cccggcgact tcatcgacta 360  
 cgaggaaactg cgggagcagc tgagcagcgt gtccagcttc gagcggttcg agatcttccc 420  
 caagaccagc tcttggccca accacgacag caacaagggc gtgaccgccg cctgtcctca 480  
 cgctggcgcc aagagcttct acaagaacct gatctggctg gtcaagaagg gcaacagcta 540  
 ccccaaactg agcaagagct acatcaacga caagggcaaa gaagtgctgg tgctgtgggg 600  
 catccaccac cctagacca gcgccacca gcagagcctg taccagaacg ccgacgccta 660  
 cgtgttcgtg ggacgagcc ggtacagcaa gaagttcaag cccgagatcg ccatcagacc 720  
 caaagtgcgg gaccaagagg gccggatgaa ctactactgg accctgggtg agcccggcga 780  
 caagatcacc ttcgaggcca ccggcaatct ggtcgtgccc agatacgcct tcgcatgga 840  
 aagaaacgcc ggcagcggca tcatcatcag cgacaccccc gtgcacgact gcaacaccac 900  
 ctgtcagacc cccaaaggcg ccatcaacac cagcctgccc ttccagaaca tccaccccat 960  
 caccatcggc aagtgccta agtacgtgaa gtctaccaag ctgaggctgg ccacaggcct 1020  
 gcggaacatc cccagcatcc agagcagagg cctgtttggc gccattgccg gctttatcga 1080  
 gggcggctgg accggaatgg tggatggatg gtatggctac caccaccaga atgagcaggg 1140  
 aagcggctac gccgccgacc tgaagtccac acagaacgcc atcgacgaga tcaccaacaa 1200  
 agtgaactca gtgatcgaga agatgaacac ccagttcacc gccgtgggca aagaattcaa 1260  
 ccacctggaa aagcggatcg agaacctgaa caagaaggtg gacgacggct tcctggacat 1320  
 ctggacctac aacgccgagc tgctcgtgct gctggaaaac gagcggaccc tggactacca 1380  
 cgactccaac gtgaagaatc tgtacgagaa agttcgctcc cagctgaaga acaacgccaa 1440  
 agagatcggc aacggctgct tcgagttcta ccacaagtgc gacaacacct gtatggaaa 1500  
 cgtgaagaac ggcacctacg actaccccaa gtacagcgag gaagccaagc tgaaccggga 1560  
 agagatcgac ggcgtggata tcagatctct ggtgccaaga ggatctccag gatctggata 1620  
 catcccagag gctccaagag atggacaagc ttacgtgaga aaggacggag agtgggtgct 1680  
 gctgtctact ttcctgggac accaccacca ccaccactaa 1720

<210> 8  
 <211> 567  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la gripe A

<400> 8

Met Lys Val Lys Leu Leu Val Leu Leu Cys Thr Phe Thr Ala Thr Tyr  
 1 5 10 15

10

ES 2 784 189 T3

Ala Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr  
 20 25 30

Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn  
 35 40 45

Leu Leu Glu Asp Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Leu Leu Lys Gly Ile  
 50 55 60

Ala Pro Leu Gln Leu Gly Asn Cys Ser Val Ala Gly Trp Ile Leu Gly  
 65 70 75 80

Asn Pro Glu Cys Glu Leu Leu Ile Ser Lys Glu Ser Trp Ser Tyr Ile  
 85 90 95

Val Glu Thr Pro Asn Pro Glu Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Tyr Phe  
 100 105 110

Ala Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe  
 115 120 125

Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu Ser Ser Trp Pro Asn His Thr  
 130 135 140

Val Thr Lys Gly Val Ser Ala Ser Cys Ser His Asn Gly Lys Ser Ser  
 145 150 155 160

Phe Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Gly Lys Asn Gly Leu Tyr Pro  
 165 170 175

Asn Leu Ser Lys Ser Tyr Ala Asn Asn Lys Glu Lys Glu Val Leu Val  
 180 185 190

Leu Trp Gly Val His His Pro Pro Asn Ile Gly Asp Gln Arg Ala Leu  
 195 200 205

Tyr His Thr Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Ser Ser His Tyr Ser  
 210 215 220

Arg Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Lys Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln  
 225 230 235 240

Glu Gly Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Glu Pro Gly Asp Thr  
 245 250 255

Ile Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Arg Tyr Ala Phe  
 260 265 270

Ala Leu Ser Arg Gly Phe Gly Ser Gly Ile Ile Thr Ser Asn Ala Pro



ES 2 784 189 T3

<210> 9  
 <211> 1704  
 <212> ADN  
 <213> Virus de la gripe A

5 <400> 9

```

atgaaggatga aactgctggt gctgctgtgc accttcaccg ccacctacgc cgacaccatc      60
tgcacgcggt accacgcca caacagcacc gacaccgtgg ataccggtct ggaaaagaac      120
gtgaccgtga cccacagcgt gaacctgctg gaagatagcc acaacggcaa gctgtgcctg      180
ctgaagggca ttgccccct gcagctgggc aactgtagcg tggccggctg gattctgggc      240
aaccgccagt gcgagctgct gatcagcaaa gagtccctggt cctacatcgt ggagacaccc      300
aaccgccaga acggcacctg ttacccccgc tacttcgccg actacgagga actgagagag      360
cagctgtcct ctgtctccag cttcgagcgg ttcgagatct tccccaaaga gagcagctgg      420
cccaaccaca ccgtgacaaa gggcgtgagc gccagctgct cccacaatgg caagagcagc      480
ttctaccgga acctgctgtg gctgaccggc aagaacggcc tgtaccctca cctgagcaag      540
agctatgcca acaacaaaga gaaagaggtc ctctcctct gggcgtgca ccaccccccc      600
aacatcggcg accagcgggc cctgtaccac accgagaacg cctacgtgtc cgtggtgtcc      660
agccactaca gcagacgggt cacccccag atcgccaaga ggcccaaagt gcgggaccag      720
gaaggccgga tcaactacta ctggaccctg ctggaacccg gcgacacat catcttcgag      780
gccaacggca acctgatcgc ccccagatac gcctttgcc tgagcagagg cttcggcagc      840
ggcatcatca ccagcaacgc ccccatggac gagtgcgag ccaagtgtca gacccccag      900
ggcgccatca acagcagcct gcccttcag aacgtgcacc ccgtgacat cggcgagtgc      960
cctaagtacg tgcggagcac caagctgaga atggtgaccg gcctgcggaa catccccagc     1020
atccagagca gaggcctggt tggcgccatt gccggcttta tcgagggcgg ctggaccgga     1080
atggtggacg ggtggtacgg ctaccaccac cagaatgagc agggcagcgg ctacccgcc     1140
gatcagaagt ccaccagaa cgctatcaac ggcacacca acaaagtga cagcgtgatc     1200
gagaagatga acaccagtt caccgccgtg ggcaaagagt tcaacaagct ggaacggcgg     1260
atggaaaacc tgaacaagaa ggtggacgac ggcttcctgg acatctggac ctacaacgcc     1320
gagctgctgg tcctgctgga aaacgagcgg accctggact tccacgacag caactgaa     1380
aacctgtacg agaaagtga gtcccagctg aagaacaacg ccaaagat cggcaacggc     1440
tgcttcgagt tctaccacia gtgcaacgac gagtgcattg aaagcgtgaa gaacggcaca     1500
tacgactacc ccaagtacag cgaggaaagc aagctgaacc gggagaagat cgacggcgtg     1560
gatatcagat ctctggtgcc aagaggatct ccaggatctg gatacatccc agaggctcca     1620
agagatggac aagcttacgt gagaaaggac ggagagtggg tgctgctgtc tactttcctg     1680
ggacaccacc accaccacca ctaa
    
```

ES 2 784 189 T3

<210> 10  
 <211> 567  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la gripe A

5 <400> 10

Met Lys Val Lys Leu Leu Val Leu Leu Cys Thr Phe Thr Ala Thr Tyr  
 1 5 10 15

Ala Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr  
 20 25 30

Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn  
 35 40 45

Leu Leu Glu Asp Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Leu Leu Lys Gly Ile  
 50 55 60

Ala Pro Leu Gln Leu Gly Asn Cys Ser Val Ala Gly Trp Ile Leu Gly  
 65 70 75 80

Asn Pro Glu Cys Glu Leu Leu Ile Ser Lys Glu Ser Trp Ser Tyr Ile  
 85 90 95

Val Glu Thr Pro Asn Pro Glu Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly His Phe  
 100 105 110

Ala Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe  
 115 120 125

Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu Ser Ser Trp Pro Asn His Asp  
 130 135 140

Thr Val Thr Gly Val Ser Ala Ser Cys Ser His Asn Gly Glu Ser Ser  
 145 150 155 160

Phe Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Gly Lys Asn Gly Leu Tyr Pro  
 165 170 175

Asn Leu Ser Lys Ser Tyr Ala Asn Asn Lys Glu Lys Glu Val Leu Val  
 180 185 190

ES 2 784 189 T3

Leu Trp Gly Val His His Pro Pro Asn Ile Gly Asp Gln Lys Ala Leu  
 195 200 205

Tyr His Thr Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Ser Ser His Tyr Ser  
 210 215 220

Arg Lys Phe Thr Pro Glu Ile Ala Lys Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln  
 225 230 235 240

Glu Gly Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Glu Pro Gly Asp Thr  
 245 250 255

Ile Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Arg Tyr Ala Phe  
 260 265 270

Ala Leu Ser Arg Gly Phe Gly Ser Gly Ile Ile Asn Ser Asn Ala Pro  
 275 280 285

Met Asp Lys Cys Asp Ala Lys Cys Gln Thr Pro Gln Gly Ala Ile Asn  
 290 295 300

Ser Ser Leu Pro Phe Gln Asn Val His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys  
 305 310 315 320

Pro Lys Tyr Val Arg Ser Ala Lys Leu Arg Met Val Thr Gly Leu Arg  
 325 330 335

Asn Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly  
 340 345 350

Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr  
 355 360 365

His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Lys Ser  
 370 375 380

Thr Gln Asn Ala Ile Asn Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile  
 385 390 395 400

Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Lys  
 405 410 415

Leu Glu Arg Arg Met Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe  
 420 425 430

Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn  
 435 440 445

Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu



ES 2 784 189 T3

ggcatcatca acagcaacgc ccccatggac aagtgcgacg ccaagtgccca gacaccccag 900  
 ggcgccatca acagctccct gcccttccag aacgtgcacc ccgtgaccat cggcgagtgc 960  
 cctaagtacg tgcggagcgc caagctgaga atggtgaccg gcctgcggaa catccccagc 1020  
 atccagagca gaggcctggt tggcgccatt gccggcttta tcgagggcgg ctggaccgga 1080  
 atggtggacg ggtggtacgg ctaccaccac cagaatgagc agggcagcgg ctacgccgcc 1140  
 gatcagaagt ccaccagaa cgccatcaac ggcatcacca acaaagtga cagcgtgatc 1200  
 gagaagatga acaccagtt caccgccgtg ggcaaagagt tcaacaagct ggaacggcgg 1260  
 atggaaaacc tgaacaagaa ggtggacgac ggcttctgg acatctggac ctacaacgcc 1320  
 gagctgctgg tgctgctgga aaacgagcgg accctggact tccacgacag caacgtgaag 1380  
 aacctgtacg agaaagtga gtcccagctg aagaacaacg ccaaagagat cggcaacggc 1440  
 tgcttcgagt tctaccacaa gtgcaacgac gagtgcacgg aaagcgtgaa gaacggcaca 1500  
 tacgactacc ccaagtacag cgaggaaagc aagctgaacc gggagaagat cgacggcgtg 1560  
 gatatcagat ctctggtgcc aagaggatct ccaggatctg gatacatccc agaggctcca 1620  
 agagatggac aagcttacgt gagaaaggac ggagagtggg tgctgctgtc tactttcctg 1680  
 ggacaccacc accaccacca ctaa 1704

<210> 12

<211> 298

5 <212> PRT

<213> Virus sincitial respiratorio humano

<400> 12

ES 2 784 189 T3

Thr Ile Leu Ala Ser Thr Thr Pro Ser Val Lys Ser Thr Leu Gln Ser  
115 120 125

Thr Thr Val Lys Thr Lys Asn Thr Thr Thr Thr Lys Ile Gln Pro Ser  
130 135 140

Lys Pro Thr Thr Lys Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Asn Lys Pro Asn  
145 150 155 160

Asn Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys  
165 170 175

Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys  
180 185 190

Lys Pro Gly Lys Lys Thr Thr Thr Lys Pro Thr Lys Lys Pro Thr Ile  
195 200 205

Lys Thr Thr Lys Lys Asp Leu Lys Pro Gln Thr Thr Lys Pro Lys Glu  
210 215 220

Val Pro Thr Thr Lys Pro Thr Glu Lys Pro Thr Ile Asn Thr Thr Lys  
225 230 235 240

Thr Asn Ile Arg Thr Thr Leu Leu Thr Asn Asn Thr Thr Gly Asn Pro  
245 250 255

Glu His Thr Ser Gln Lys Gly Thr Leu His Ser Thr Ser Ser Asp Gly  
260 265 270

Asn Pro Ser Pro Ser Gln Val Tyr Thr Thr Ser Glu Tyr Leu Ser Gln  
275 280 285

Pro Pro Ser Pro Ser Asn Thr Thr Asn Gln  
290 295

<210> 13  
<211> 495  
5 <212> PRT  
<213> Virus Dengue

<400> 13

Met Arg Cys Val Gly Ile Gly Asn Arg Asp Phe Val Glu Gly Leu Ser  
1 5 10 15

Gly Ala Thr Trp Val Asp Val Val Leu Glu His Gly Ser Cys Val Thr  
20 25 30

Thr Met Ala Lys Asn Lys Pro Thr Leu Asp Ile Glu Leu Leu Lys Thr

10



ES 2 784 189 T3

Ser Phe Lys Leu Glu Lys Glu Val Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Val  
305 310 315 320

Leu Val Gln Val Lys Tyr Glu Gly Thr Asp Ala Pro Cys Lys Ile Pro  
325 330 335

Phe Ser Thr Gln Asp Glu Lys Gly Val Thr Gln Asn Gly Arg Leu Ile  
340 345 350

Thr Ala Asn Pro Ile Val Thr Asp Lys Glu Lys Pro Val Asn Ile Glu  
355 360 365

Thr Glu Pro Pro Phe Gly Glu Ser Tyr Ile Val Ile Gly Ala Gly Glu  
370 375 380

Lys Ala Leu Lys Leu Ser Trp Phe Lys Lys Gly Ser Ser Ile Gly Lys  
385 390 395 400

Met Phe Glu Ala Thr Ala Arg Gly Ala Arg Arg Met Ala Ile Leu Gly  
405 410 415

Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Ile Gly Gly Ala Phe Thr Ser Val  
420 425 430

Gly Lys Leu Val His Gln Val Phe Gly Thr Ala Tyr Gly Val Leu Phe  
435 440 445

Ser Gly Val Ser Trp Thr Met Lys Ile Gly Ile Gly Ile Leu Leu Thr  
450 455 460

Trp Leu Gly Leu Asn Ser Arg Ser Thr Ser Leu Ser Met Thr Cys Ile  
465 470 475 480

Ala Val Gly Met Val Thr Leu Tyr Leu Gly Val Val Val Gln Ala  
485 490 495

<210> 14

<211> 192

<212> PRT

5 <213> Virus de la Hepatitis C

<400> 14

Ala Glu Val Lys Asn Ile Ser Thr Gly Tyr Met Val Thr Asn Asp Cys  
1 5 10 15

Thr Asn Asp Ser Ile Thr Trp Gln Leu Gln Ala Ala Val Leu His Val  
20 25 30

ES 2 784 189 T3

Pro Gly Cys Val Pro Cys Glu Lys Val Gly Asn Thr Ser Arg Cys Trp  
 35 40 45

Ile Pro Val Ser Pro Asn Val Ala Val Gln Gln Pro Gly Ala Leu Thr  
 50 55 60

Gln Gly Leu Arg Thr His Ile Asp Met Val Val Met Ser Ala Thr Leu  
 65 70 75 80

Cys Ser Ala Leu Tyr Val Gly Asp Leu Cys Gly Gly Val Met Leu Ala  
 85 90 95

Ala Gln Met Phe Ile Val Ser Pro Gln His His Trp Phe Val Gln Asp  
 100 105 110

Cys Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly Thr Ile Thr Gly His Arg Met Ala  
 115 120 125

Trp Asp Met Met Met Asn Trp Ser Pro Thr Ala Thr Met Ile Leu Ala  
 130 135 140

Tyr Ala Met Arg Val Pro Glu Val Ile Ile Asp Ile Ile Gly Gly Ala  
 145 150 155 160

His Trp Gly Val Met Phe Gly Leu Ala Tyr Phe Ser Met Gln Gly Ala  
 165 170 175

Trp Ala Lys Val Val Val Ile Leu Leu Leu Ala Ala Gly Val Asp Ala  
 180 185 190

<210> 15

<211> 478

5 <212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 15

Leu Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Lys Glu Ala Thr  
 1 5 10 15

Thr Thr Leu Phe Cys Ala Ser Asp Ala Lys Ala Tyr Asp Thr Glu Val  
 20 25 30

His Asn Val Trp Ala Thr His Ala Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn Pro  
 35 40 45

Gln Glu Val Val Leu Val Asn Val Thr Glu Asn Phe Asn Met Trp Lys  
 50 55 60

Asn Asp Met Val Glu Gln Met His Glu Asp Ile Ile Ser Leu Trp Asp  
 65 70 75 80

ES 2 784 189 T3

Gln Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Ser Leu  
85 90 95

Lys Cys Thr Asp Leu Lys Asn Asp Thr Asn Thr Asn Ser Ser Ser Gly  
100 105 110

Arg Met Ile Met Glu Lys Gly Glu Ile Lys Asn Cys Ser Phe Asn Ile  
115 120 125

Ser Thr Ser Ile Arg Gly Lys Val Gln Lys Glu Tyr Ala Phe Phe Tyr  
130 135 140

Lys Leu Asp Ile Ile Pro Ile Asp Asn Asp Thr Thr Ser Tyr Lys Leu  
145 150 155 160

Thr Ser Cys Asn Thr Ser Val Ile Thr Gln Ala Cys Pro Lys Val Ser  
165 170 175

Phe Glu Pro Ile Pro Ile His Tyr Cys Ala Pro Ala Gly Phe Ala Ile  
180 185 190

Leu Lys Cys Asn Asn Lys Thr Phe Asn Gly Thr Gly Pro Cys Thr Asn  
195 200 205

Val Ser Thr Val Gln Cys Thr His Gly Ile Arg Pro Val Val Ser Thr  
210 215 220

Gln Leu Leu Leu Asn Gly Ser Leu Ala Glu Glu Glu Val Val Ile Arg  
225 230 235 240

Ser Val Asn Phe Thr Asp Asn Ala Lys Thr Ile Ile Val Gln Leu Asn  
245 250 255

Thr Ser Val Glu Ile Asn Cys Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Lys  
260 265 270

Arg Ile Arg Ile Gln Arg Gly Pro Gly Arg Ala Phe Val Thr Ile Gly  
275 280 285

Lys Ile Gly Asn Met Arg Gln Ala His Cys Asn Ile Ser Arg Ala Lys  
290 295 300

Trp Asn Asn Thr Leu Lys Gln Ile Ala Ser Lys Leu Arg Glu Gln Phe  
305 310 315 320

Gly Asn Asn Lys Thr Ile Ile Phe Lys Gln Ser Ser Gly Gly Asp Pro  
325 330 335

ES 2 784 189 T3

Glu Ile Val Thr His Ser Phe Asn Cys Gly Gly Glu Phe Phe Tyr Cys  
 340 345 350

Asn Ser Thr Gln Leu Phe Asn Ser Thr Trp Phe Asn Ser Thr Trp Ser  
 355 360 365

Thr Glu Gly Ser Asn Asn Thr Glu Gly Ser Asp Thr Ile Thr Leu Pro  
 370 375 380

Cys Arg Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Lys Val Gly Lys Ala  
 385 390 395 400

Met Tyr Ala Pro Pro Ile Ser Gly Gln Ile Arg Cys Ser Ser Asn Ile  
 405 410 415

Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Asn Ser Asn Asn Glu Ser  
 420 425 430

Glu Ile Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp Asn Trp Arg Ser  
 435 440 445

Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val Ala  
 450 455 460

Pro Thr Lys Ala Lys Arg Arg Val Val Gln Arg Glu Lys Arg  
 465 470 475

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición inmunogénica que comprende: una glicoproteína hemaglutinina (HA) del virus de la gripe parcialmente glicosilada, en donde la glicoproteína HA comprende uno o más sitios de glicosilación a los que está unido un glicano, y en donde el glicano consiste en un residuo azúcar, dos residuos azúcar o tres residuos azúcar.
- 5 2. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, en donde la glicoproteína HA del virus de la gripe es de una cepa de gripe seleccionada del grupo que consiste en H1, H3 y H5.
3. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde al menos uno de los uno o más sitios de glicosilación de la glicoproteína HA del virus de la gripe parcialmente glicosilada comprende un glicano que consiste en un residuo azúcar.
- 10 4. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde al menos uno de los uno o más sitios de glicosilación de la glicoproteína HA del virus de la gripe parcialmente glicosilada comprende un glicano que consiste en un solo residuo de N-acetilglucosamina (GlcNAc).
5. Un método para preparar la composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende:
  - 15 (i) obtener una glicoproteína hemaglutinina (HA) del virus de la gripe,
  - (ii) desglicosilar la glicoproteína HA del virus de la gripe mediante digestión con glicosidasa, formando con ello la glicoproteína HA del virus de la gripe parcialmente glicosilada recogida en una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, y
  - 20 (iii) formular la glicoproteína HA del virus de la gripe parcialmente glicosilada de (ii) en una composición inmunogénica.
6. El método de la reivindicación 5, en el que la composición inmunogénica comprende un soporte y/o un excipiente.
7. El método de la reivindicación 5 o 6, en el que la glicoproteína HA del virus de la gripe es de una cepa de gripe seleccionada del grupo que consiste en H1, H3 y H5.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 5-7, en el que la digestión con glicosidasa implica EndoH o una manosidasa.
- 25 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 5-8, en el que la glicoproteína HA del virus de la gripe desglicosilada comprende un sitio de glicosilación al que está unido un glicano, y en el que el glicano consiste en una monoglicosilación.
10. Una composición inmunogénica como se recoge en una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para uso como vacuna contra la gripe.
- 30

Fig. 1

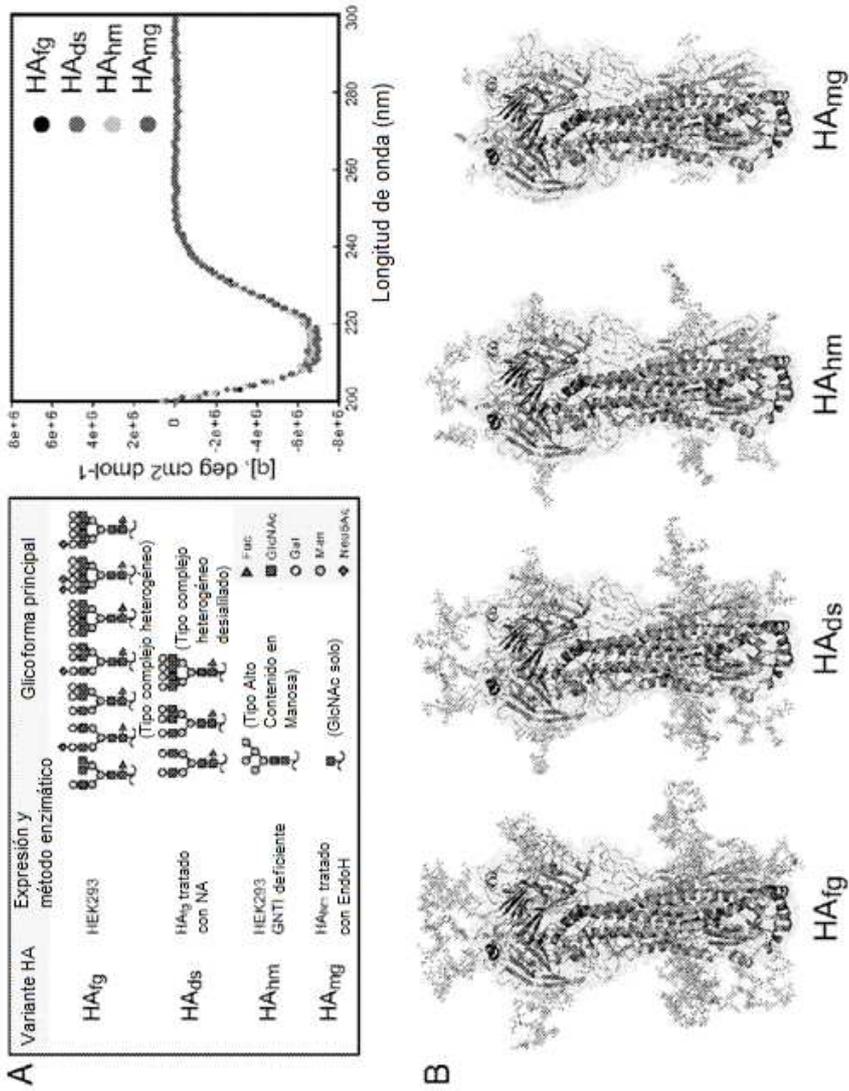
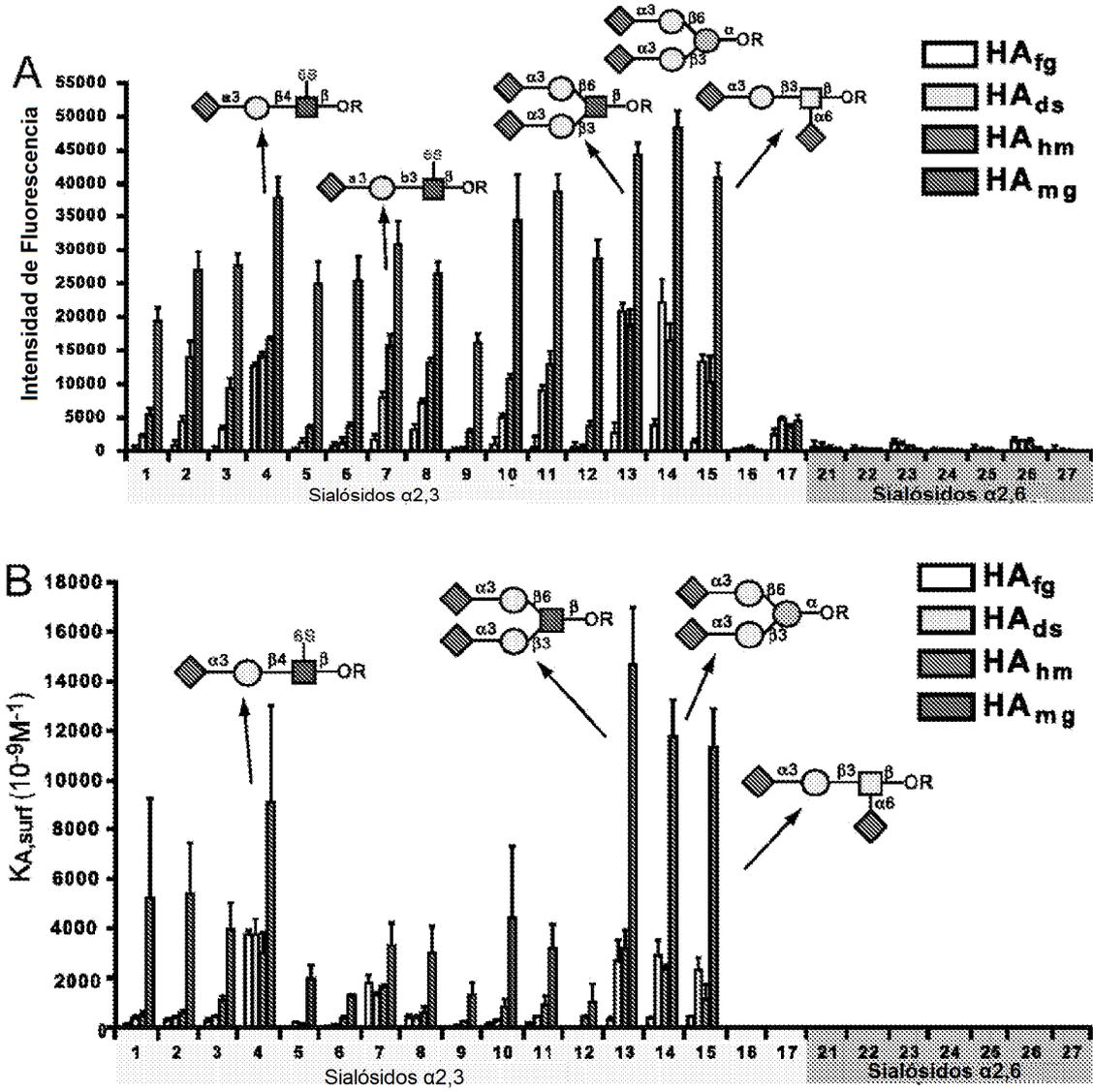


Fig. 2



Brisbane\_H1 1 .....MVKLEVICERTATYAD.....FCGYRANFTDVPVLEENIYTHVNLLENHNSKLELEKJAPLOQELAVAGWLGUPPELELREESVYVERPNEHSVEYF109  
California\_H1 1 .....MRAIIKXLYVEETANAD.....ELCUIYHNSYDNDVLEENNYTHHVALLEDYHAKIENEDVAPHHSEKKTIAAGWAGNPELESRESTASWSYVNETASLVEYF109  
Vietnam\_H5 1 .....MEHLLIFALVSVASD.....QICGSPHANSYEQDPTMEANLSTADDDJIKKHNKALCQIDBERKILBDCSAGBNLIGAMWEEVWPEBKAUYERANLHDIYF108  
Brisbane\_H3 1 MKTIIALSXCFYRQEPGNDS TALELGHAVVQSTICEETNOQIEKTEVOSSTREIEZSP-HQJGDGSLTILIDALSDQOCTQDNR-KNDLTKERSKAYSMEKRF15

Brisbane\_H1 110 SHEBYELLRQLSSVSFEFEFFRESWRNTEVTGYSNGCJNNEESFYRLLNBTGNGLNSSTARKKREYVILGVHFFPIGKCALYHTENAVASVVSYHRKRF28  
California\_H1 110 SDFIYERELRQLSSVSFEFEFFRATSNPHDSNTEVTMPHPHAKSPYKELIYVAGNSYFASSTYIDKREYVYWSHHFSSSAGQSSYONADAVFVGSYHRKRF27  
Vietnam\_H5 109 SDFEYVEERHELEBPHHEEKIDETEMSSSSHEALLSVSACRYOJLSSTFRVVRVLIHNSITFTIENVNTNOEELVWGHHPNDAMKRETRFYQPTTIVSOSTTLNRRLL25  
Brisbane\_H3 116 YRVPZASERTEVAASG---TLFNNESNBTGTGQNSSTSNAGIRRINSEESTENRHLKFAFPAZQZMPANEAFNSIIRSNHREYSDNNGIFRACSSGNETSFEHSSQTV29

Brisbane\_H1 227 TFEJRCRPRVSDQEGRIYVWTLLEGGTILFEJNGNLEMPYAFKLSRGFSGEINSNKMDKDAKOOTVQERANSSEFQNSWHPATGECPKYRARKRMJGJRNMSIDKSR644  
California\_H1 228 KREJASIRPKVYXEGRMNYVWTLVEPKITTEATGNVVERVAGAMEENASGELISOTRYHDSUTQOTPKGANSSCFQNSHPITGACPAYRTRKLFJGLRNISSQSR645  
Vietnam\_H5 226 VPRKATREKVGQSSRNEEFWTLKPNAPHEESNGHTKAEJAVKVKKQDSTANKLELVSNHTACOTVAGANSSMPHNHPLTGECPYVVRBRVJATGLNLSORETR643  
Brisbane\_H3 230 FENSGSRRFRNHPISREIIMWIKXPQIILLINSGHFAKRGYKRIH-58YSSRRSDMRISKNSSEITREDSIPADKEDONRREYVAGRRKQDNTKFLATGRNVYKQSR646

Brisbane\_H1 315 FGAJNGFIEGNTGASNGTGHQNGEGSSTADQESTQNNHSINNSSTEARNTQTVNGEENKERRNERHAYDSGFCITERNELLEULENETLDFHDSWRNLS462  
California\_H1 316 FGAJNGFIEGMSAMTQGTGHQNGEGSSTADQLQNTQNTBEITNNSYIEARNTQTVNGEENHEKRIENKAYDSGFCITERNELLEULENETLDFHDSWRNLS463  
Vietnam\_H5 314 FGAJNGFIEGNGSRRDQMSYAH5NCGSSVADKESTKQDQSVNNSNLSIDQNTQVEANGSENNHEERIELEKRNESGELQVMTYNLELVNERTLDFHDSWRNLS461  
Brisbane\_H3 317 FGAJNGFIEHGWENSTQDMSYGFADNSGELSDQADLSTAGJBOJNGLBRLLGRTNEKHHQIEKEESEVEGRQDIEKVEETKELNSYKELLEVALENDHEJLTDKEMHFF64

Brisbane\_H1 463 KVSQKRNKREKNGKFFVHRNDEQNESVANITDIPKREESREBELTGTREANGVQIENYTVASIVELLSISAFFWMSNGSRDEPFE  
California\_H1 464 KVSQKRNKREKNGKFFVHRKQDTEAESYVNTDIPNISEAKREELISVALETRIQIENYTVASIVELLSISAFFWMSNGSLQMPFE  
Vietnam\_H5 462 DKNLQLDNRKELLNGKFFVHRKQNGESYVITDRNKSEERREELREHVALEIENRISYIENSTANRLEAINTALLETWMSNGSRDEPFE  
Brisbane\_H3 465 KNTKQREMBEDNGSSEKIMHACOMAGCISLITDHDVYRDEKSNRFOITSELEKQYKQWIMSTALS-CTFLCAGALSFIMHAKOKNIFEMJCE

Fig. 4

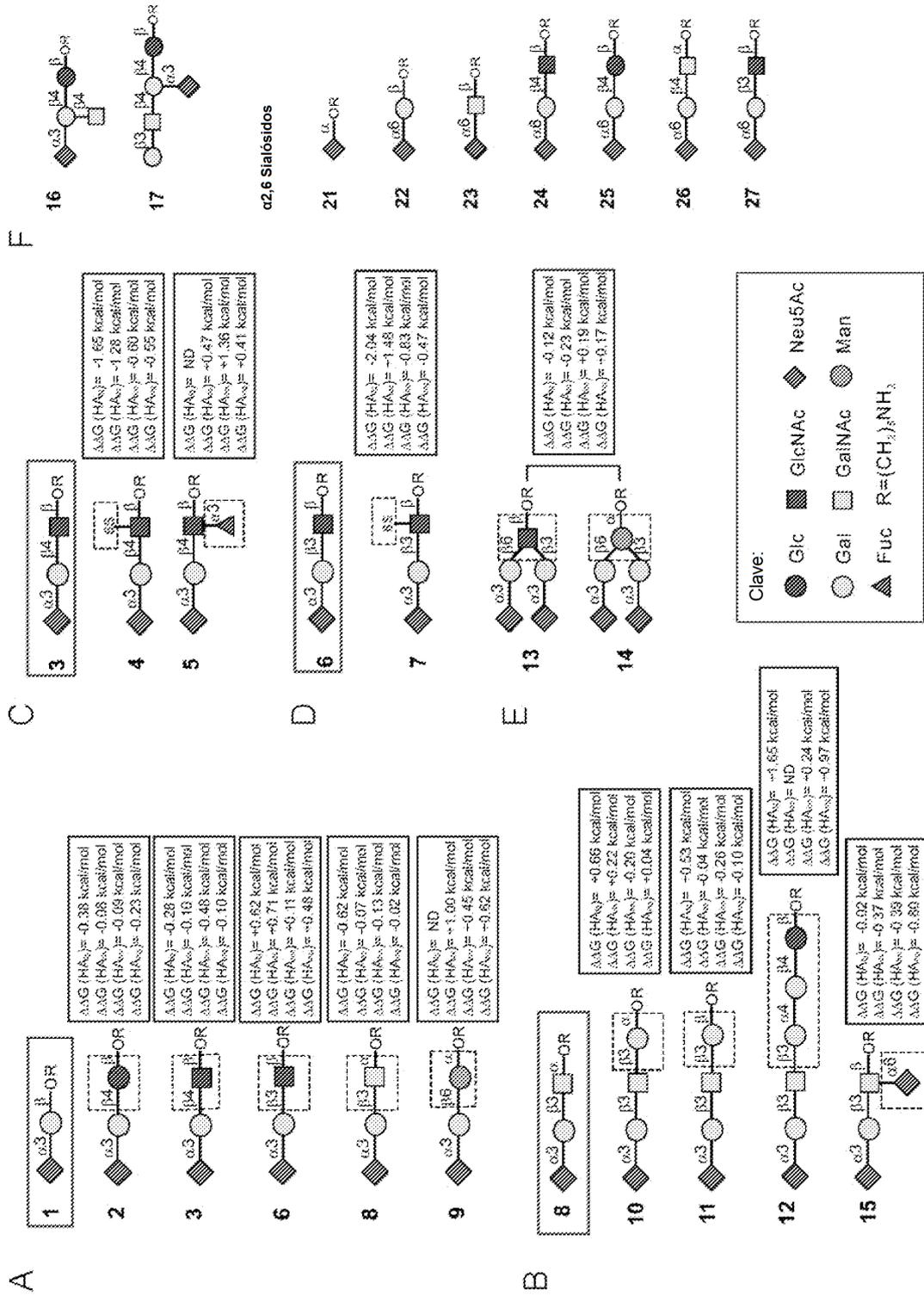
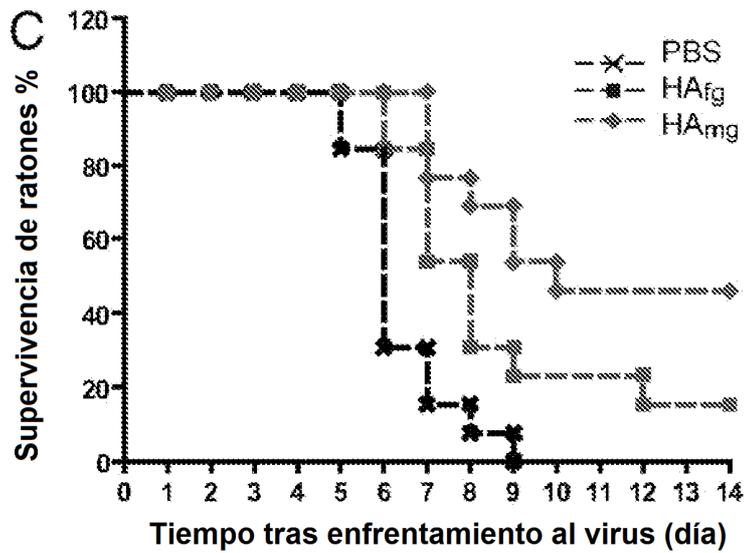
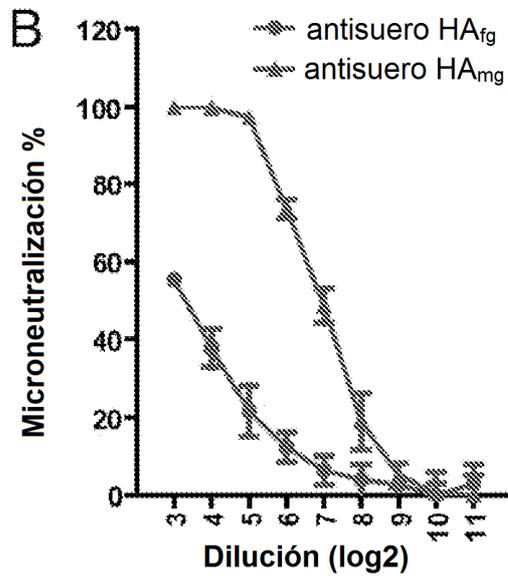
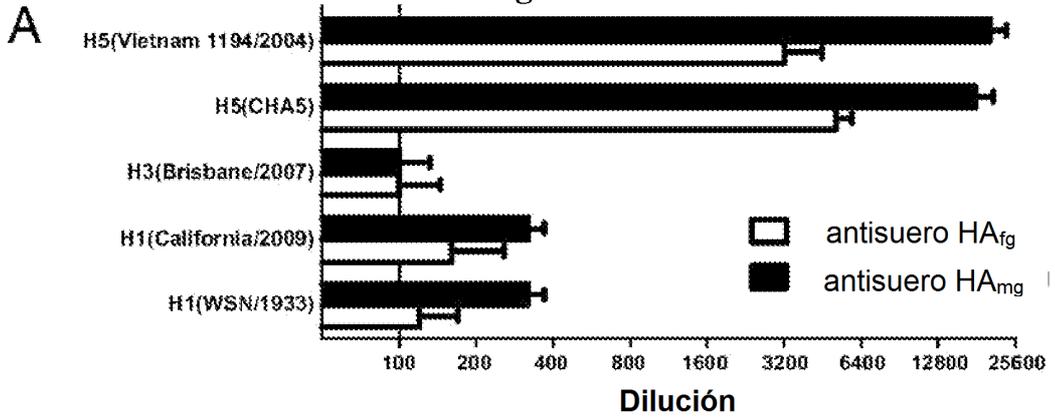
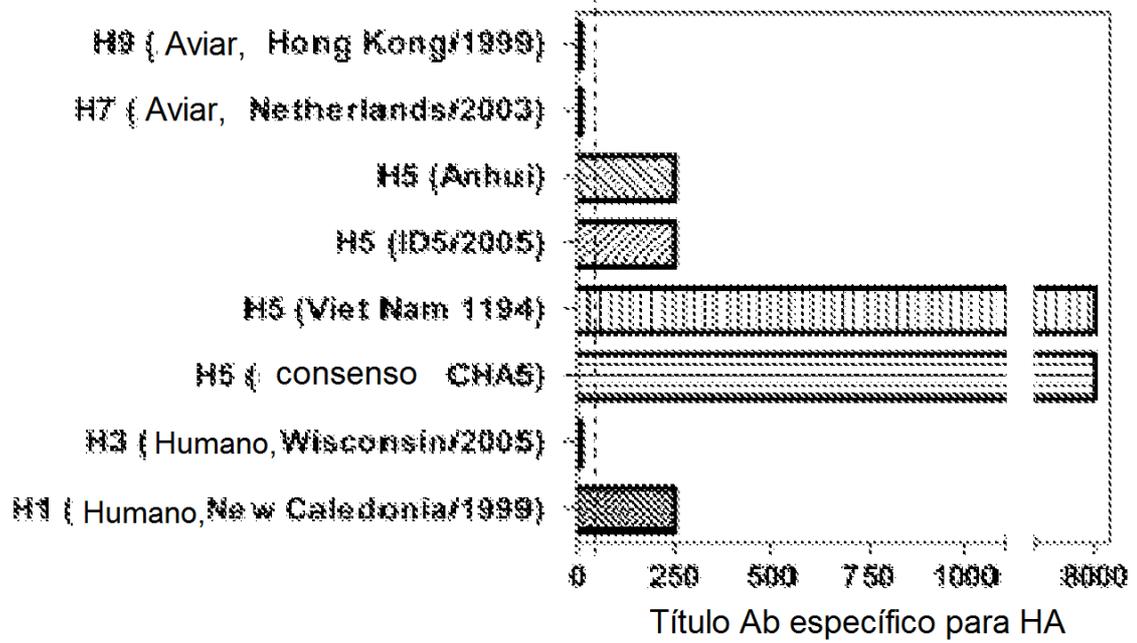


Fig. 5



**Fig. 5D**



**Fig. 6**

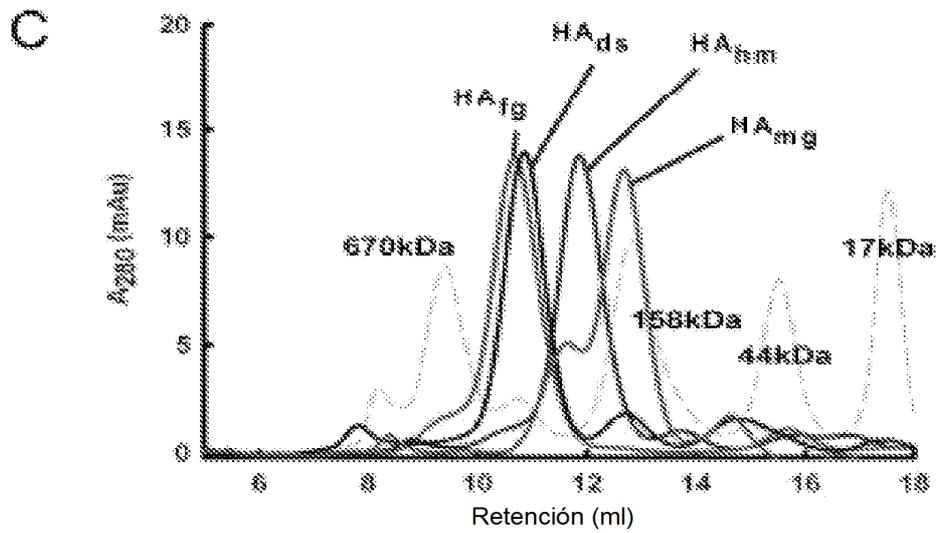
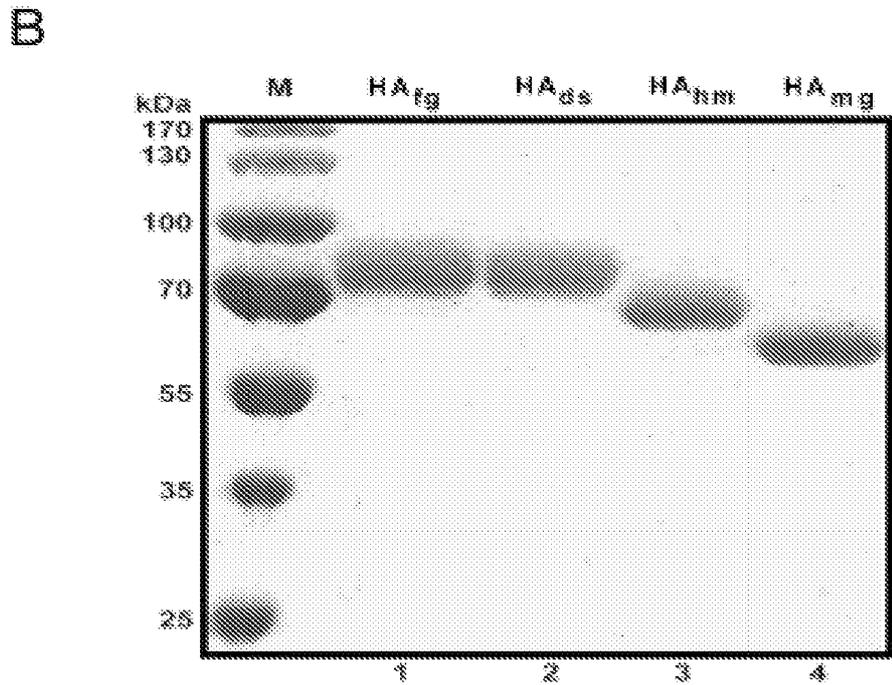
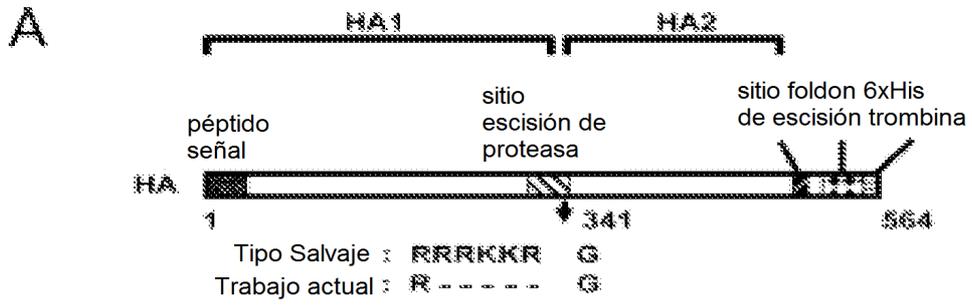


Fig. 7A

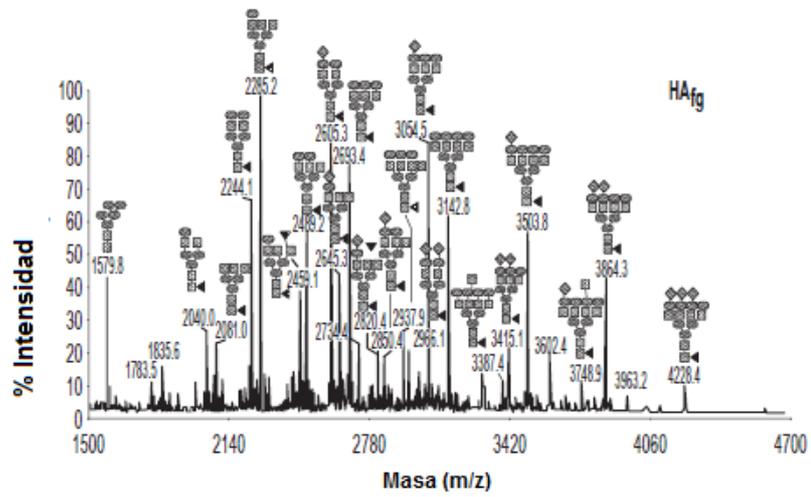


Fig. 7B

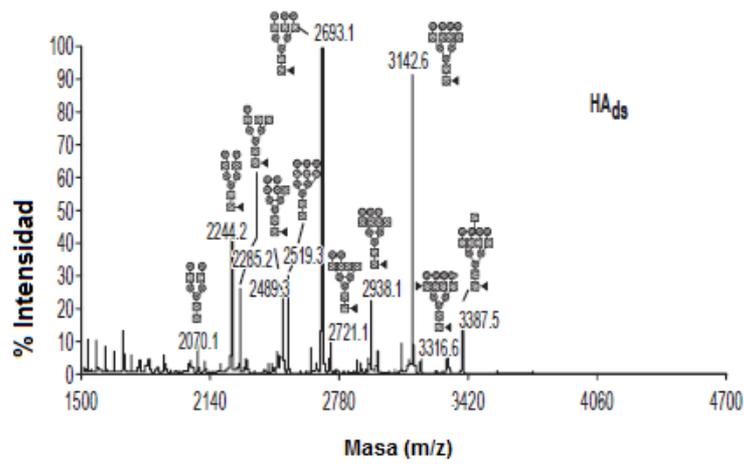


Fig. 7C

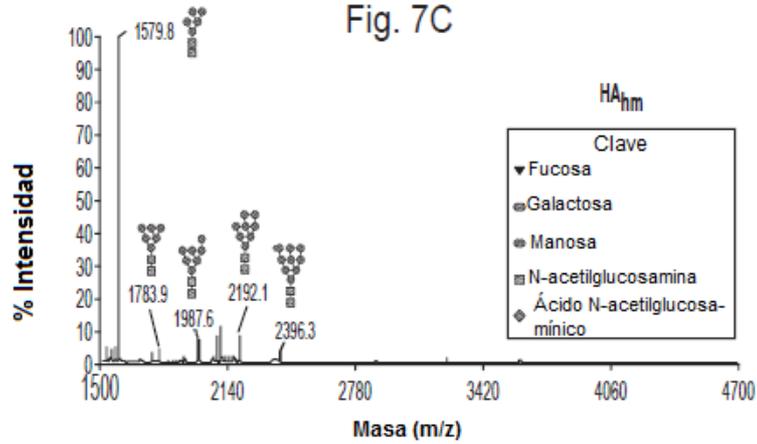


Fig. 8

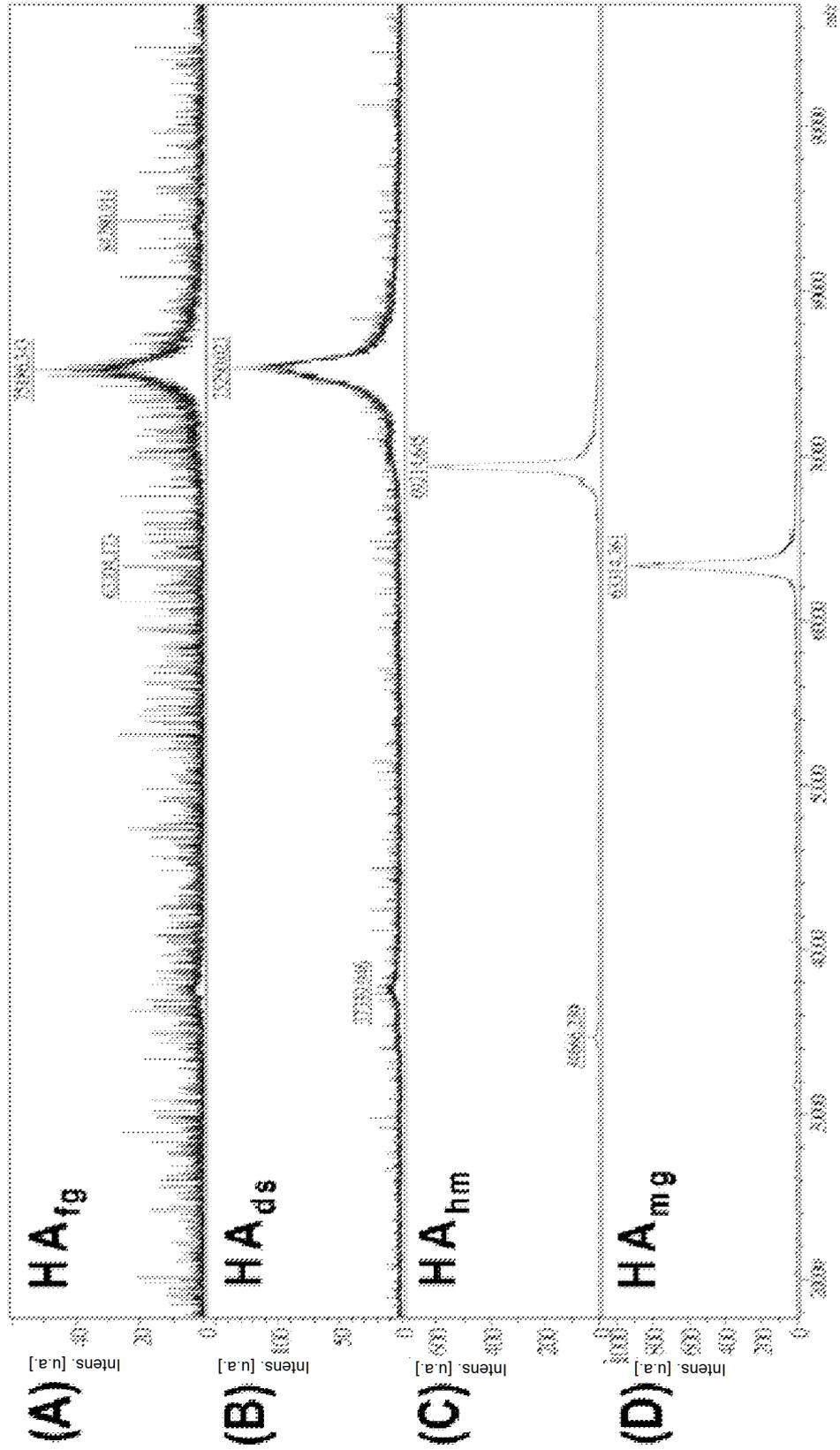


Fig. 9

Composición de N-glicano	(m/z)		
	HA <sub>fg</sub>	HA <sub>dt</sub>	HA <sub>lim</sub>
Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>2</sub>	1579.7	1579.9	1579.8
Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>3</sub>	1783.9	1783.9	1783.9
Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>4</sub> Fuc <sub>1</sub>	1835.6	1835.8	ND
Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>5</sub>	1988.0	1987.4	1988.0
Hex <sub>4</sub> HexNAc <sub>3</sub> Fuc <sub>1</sub>	2040.0	2040.1	ND
Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>5</sub> Fuc <sub>1</sub>	2081.0	2081.2	ND
Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>3</sub>	2192.1	2192.2	2192.1
Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>4</sub> Fuc <sub>1</sub>	2244.1	2244.2	ND
Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>5</sub> Fuc <sub>1</sub>	2285.1	2285.2	ND
Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>3</sub>	2396.2	2396.2	2396.2
Hex <sub>4</sub> HexNAc <sub>5</sub> Fuc <sub>1</sub>	2489.2	2489.3	ND
Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>4</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuAc <sub>1</sub>	2605.3	ND	ND
Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>5</sub> Fuc <sub>1</sub>	2693.3	2693.4	ND
Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>6</sub> Fuc <sub>1</sub>	2734.4	2734.4	ND
Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>5</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuAc <sub>1</sub>	2850.4	ND	ND
Hex <sub>4</sub> HexNAc <sub>5</sub> Fuc <sub>1</sub>	2938.5	2938.5	ND
Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>4</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuAc <sub>2</sub>	2966.5	ND	ND
Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>5</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuAc <sub>1</sub>	3054.5	ND	ND
Hex <sub>7</sub> HexNAc <sub>3</sub> Fuc <sub>1</sub>	3142.6	3142.5	ND
Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>6</sub> Fuc <sub>1</sub>	3316.5	3316.6	ND
Hex <sub>7</sub> HexNAc <sub>7</sub> Fuc <sub>1</sub>	3387.8	3387.6	ND
Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>5</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuAc <sub>2</sub>	3415.7	ND	ND
Hex <sub>7</sub> HexNAc <sub>6</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuAc <sub>1</sub>	3503.8	ND	ND
Hex <sub>7</sub> HexNAc <sub>6</sub> Fuc <sub>2</sub> NeuAc <sub>1</sub>	3677.9	ND	ND
Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>5</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuAc <sub>3</sub>	3776.9	ND	ND
Hex <sub>7</sub> HexNAc <sub>6</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuAc <sub>2</sub>	3865.0	ND	ND
Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>8</sub> Fuc <sub>2</sub> NeuAc <sub>2</sub>	4038.0	ND	ND
Hex <sub>7</sub> HexNAc <sub>6</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuAc <sub>3</sub>	4225.2	ND	ND
Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>6</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuAc <sub>4</sub>	4386.3	ND	ND

Fig. 10

	1	2	3	4	5	6	7	8
HA <sub>1g</sub> → HA <sub>4b</sub>	--0.550	--0.245	--0.371	0.007	ND	--0.482	0.097	--0.001
HA <sub>1g</sub> → HA <sub>6m</sub>	--0.731	--0.441	--0.929	0.122	ND	--1.235	--0.018	--0.246
HA <sub>1g</sub> → HA <sub>8mg</sub>	--1.770	--1.616	--1.597	--0.465	ND	--1.904	--0.327	--1.169
HA <sub>4b</sub> → HA <sub>1m</sub>	--0.181	--0.196	--0.556	0.114	0.334	--0.773	--0.115	--0.244
HA <sub>4b</sub> → HA <sub>8mg</sub>	--1.220	--1.371	--1.216	--0.492	--1.275	--1.442	--0.425	--1.168
HA <sub>6m</sub> → HA <sub>8mg</sub>	--1.039	--1.175	--0.558	--0.607	--1.609	--0.868	--0.310	--0.923

	9	10	11	12	13	14	15
HA <sub>1g</sub> → HA <sub>4b</sub>	ND	--0.429	--0.562	ND	--0.574	--0.683	--0.348
HA <sub>1g</sub> → HA <sub>1m</sub>	ND	--1.103	--1.032	--1.656	--1.403	--1.097	--0.614
HA <sub>1g</sub> → HA <sub>8mg</sub>	ND	--1.793	--1.790	--1.844	--2.294	--2.005	--1.944
HA <sub>4b</sub> → HA <sub>6m</sub>	--0.726	--0.667	--0.470	ND	--0.926	--0.414	--0.266
HA <sub>4b</sub> → HA <sub>8mg</sub>	--1.601	--1.947	--1.226	ND	--1.720	--1.322	--1.597
HA <sub>1m</sub> → HA <sub>8mg</sub>	--0.675	--0.680	--0.750	--0.186	--0.891	--0.908	--1.330

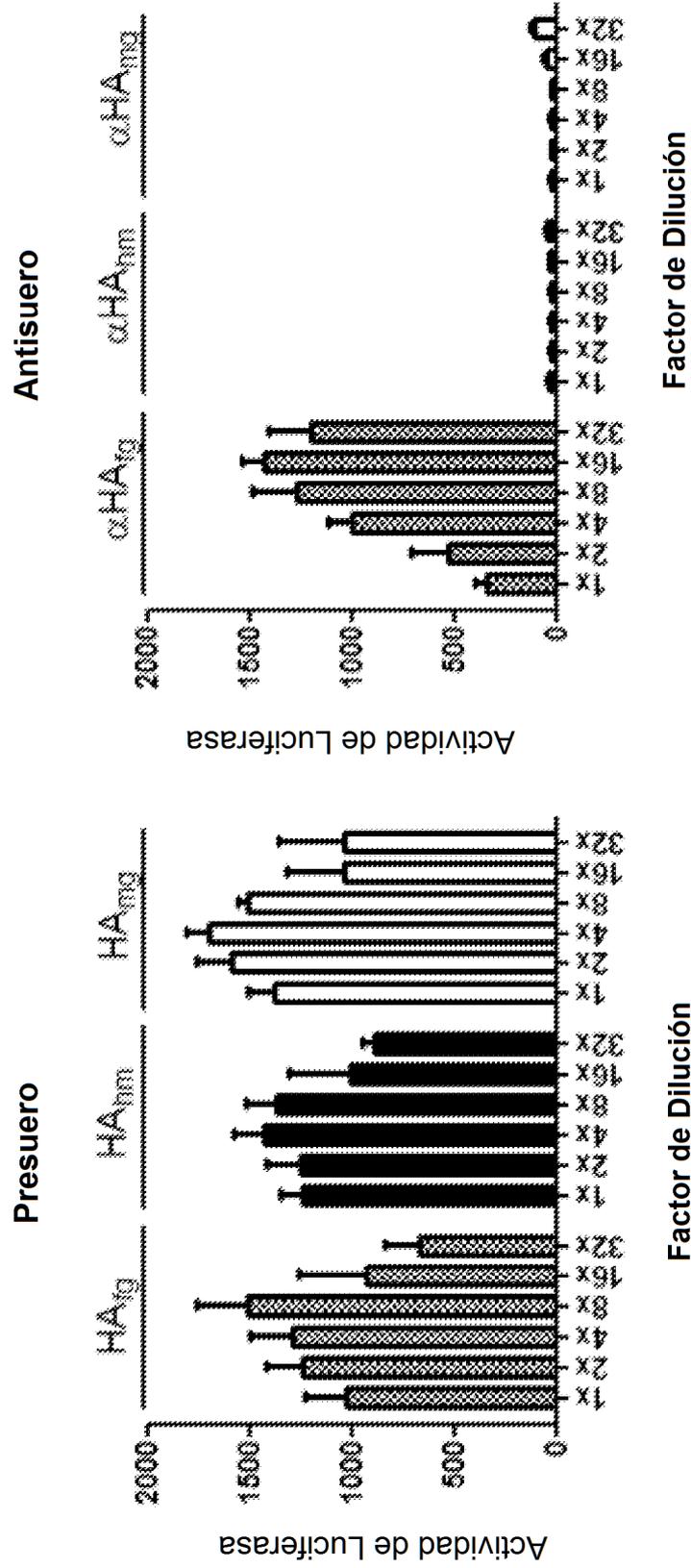
ΔΔG de variantes de HA glicosiladas en respuesta a los α2,3-sialósidos 1-15

Fig. 11

	HA <sub>Ag</sub>	HA <sub>Ab</sub>	HA <sub>Am</sub>	HA <sub>Ag</sub>
1 → 2	--0.384	--0.079	--0.094	--0.230
1 → 3	--0.379	--0.100	--0.477	--0.096
1 → 6	0.617	0.705	0.113	0.463
1 → 8	--0.618	--0.069	--0.132	--0.016
1 → 9	ND	0.909	0.454	0.619
8 → 10	0.658	0.223	--0.200	0.043
8 → 11	0.526	--0.035	--0.260	--0.095
8 → 12	1.646	ND	0.236	0.970
8 → 13	--0.023	--0.370	--0.592	--0.799
3 → 4	--1.653	--1.275	--0.602	--0.551
3 → 5	ND	0.469	1.381	0.410
6 → 7	--2.044	--1.494	--0.826	--0.467
13 → 14	--0.117	--0.226	0.168	0.172

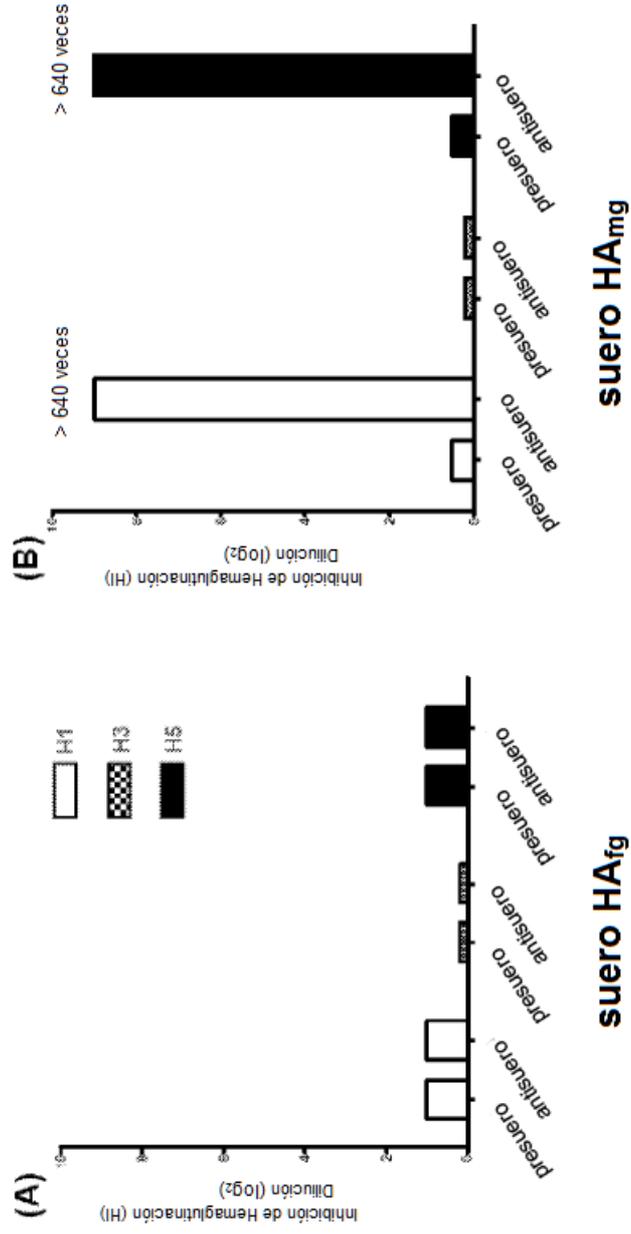
Diferencias en la unión de cambios de energía libre entre diferentes ligandos de sialósidos en respuesta a variantes de HA

Fig. 12



fg: totalmente glicosilada  
 hm: alto contenido en manosa (man5)  
 mg: mono-glicosilada

Fig. 13



HA<sub>fg</sub> y HA<sub>mg</sub> designan H5 consenso totalmente glicosilada y mono-glicosilada como antígenos para antisuero de conejo

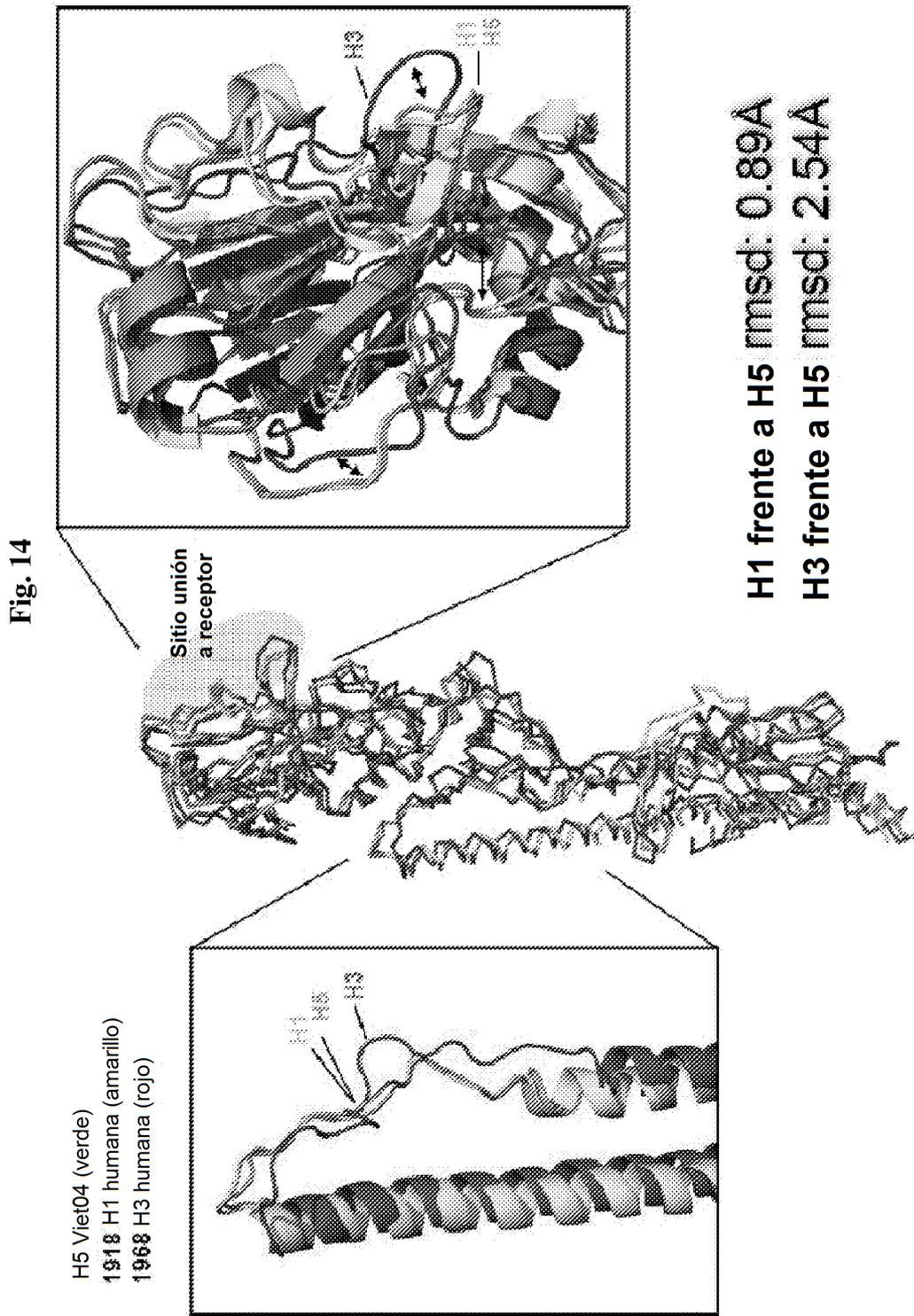
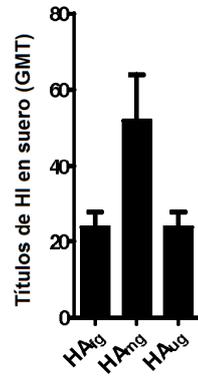
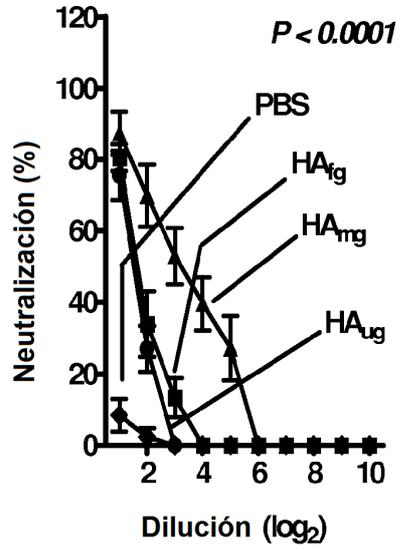


Fig. 15

**A**  
Inhibición de la hemaglutinación



**B**  
Microneutralización



**C**  
Enfrentamiento y supervivencia

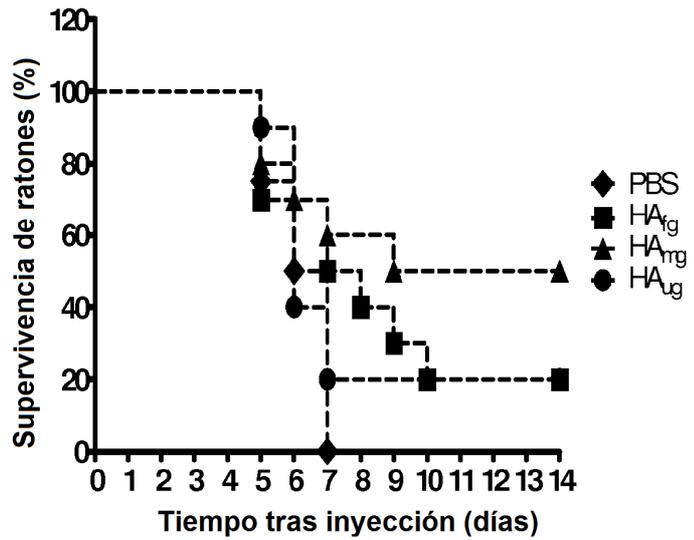
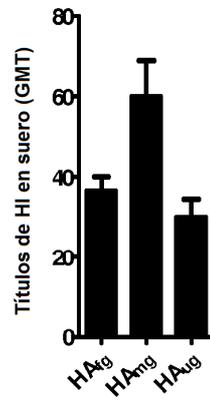
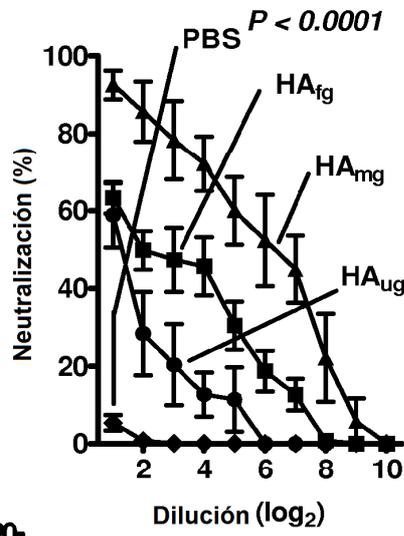


Fig. 16

**A**  
Inhibición de la hemaglutinación



**B**  
Microneutralización



**C**  
Enfrentamiento y supervivencia

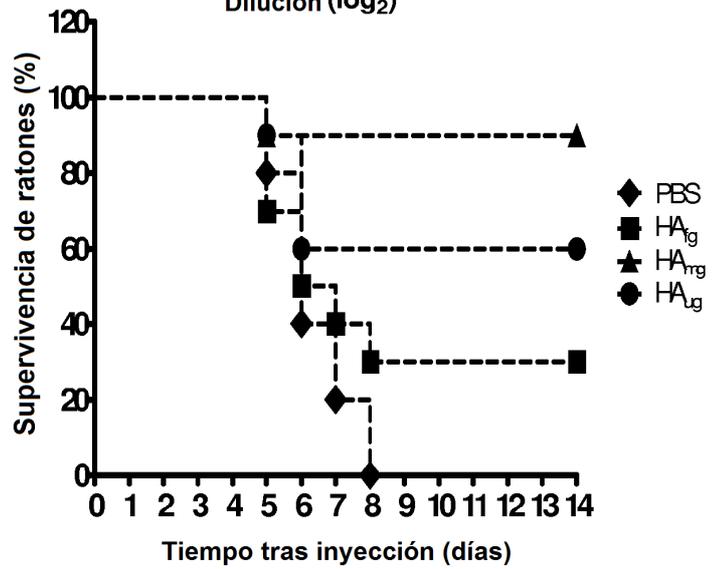
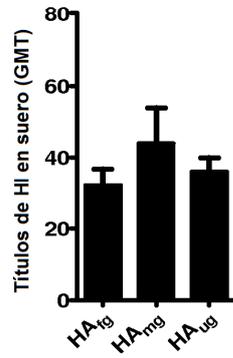
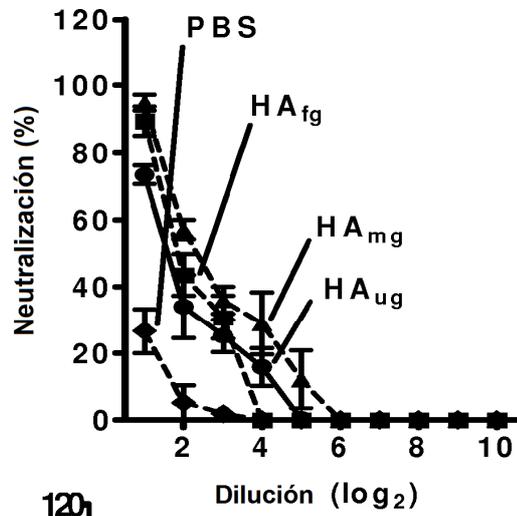


Fig. 17

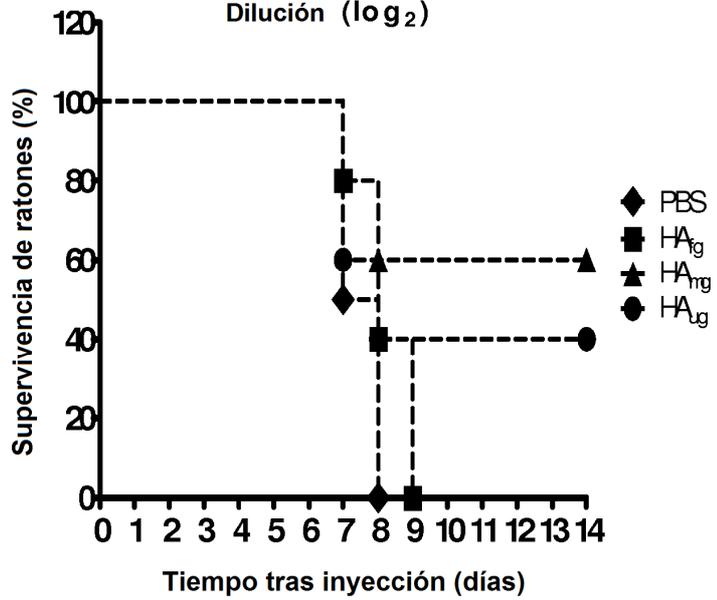
**A**  
Inhibición de la hemaglutinación



**B**  
Microneutralización

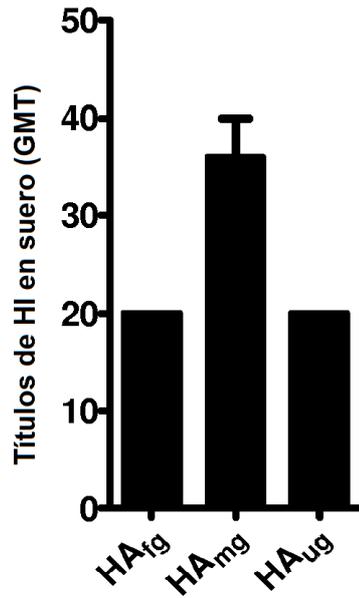


**C**  
Enfrentamiento y supervivencia



**Fig. 18**

**A** antisueros : H1 (California/2009)  
virus: WSN (H1N1)



**B** antisueros : H1 (California/2009)  
virus: WSN (H1N1)

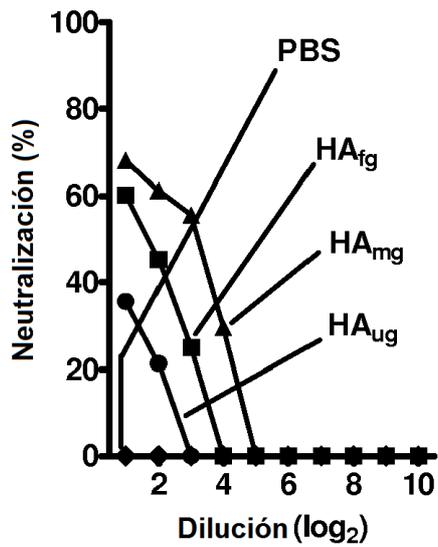


Fig. 19

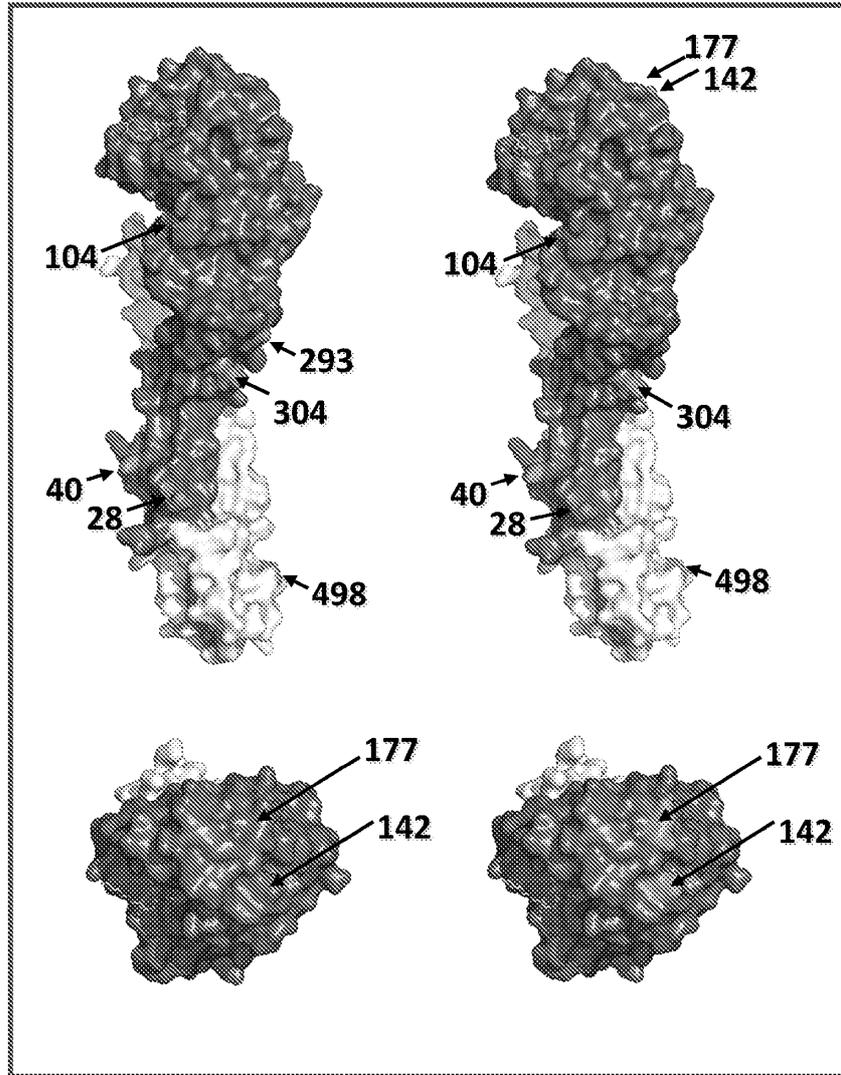
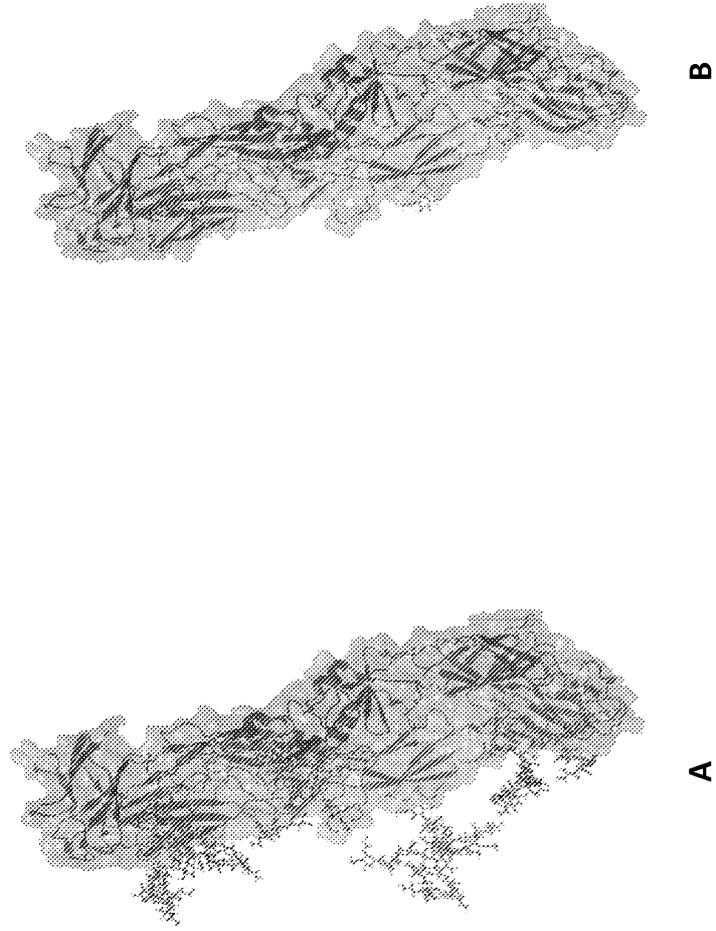
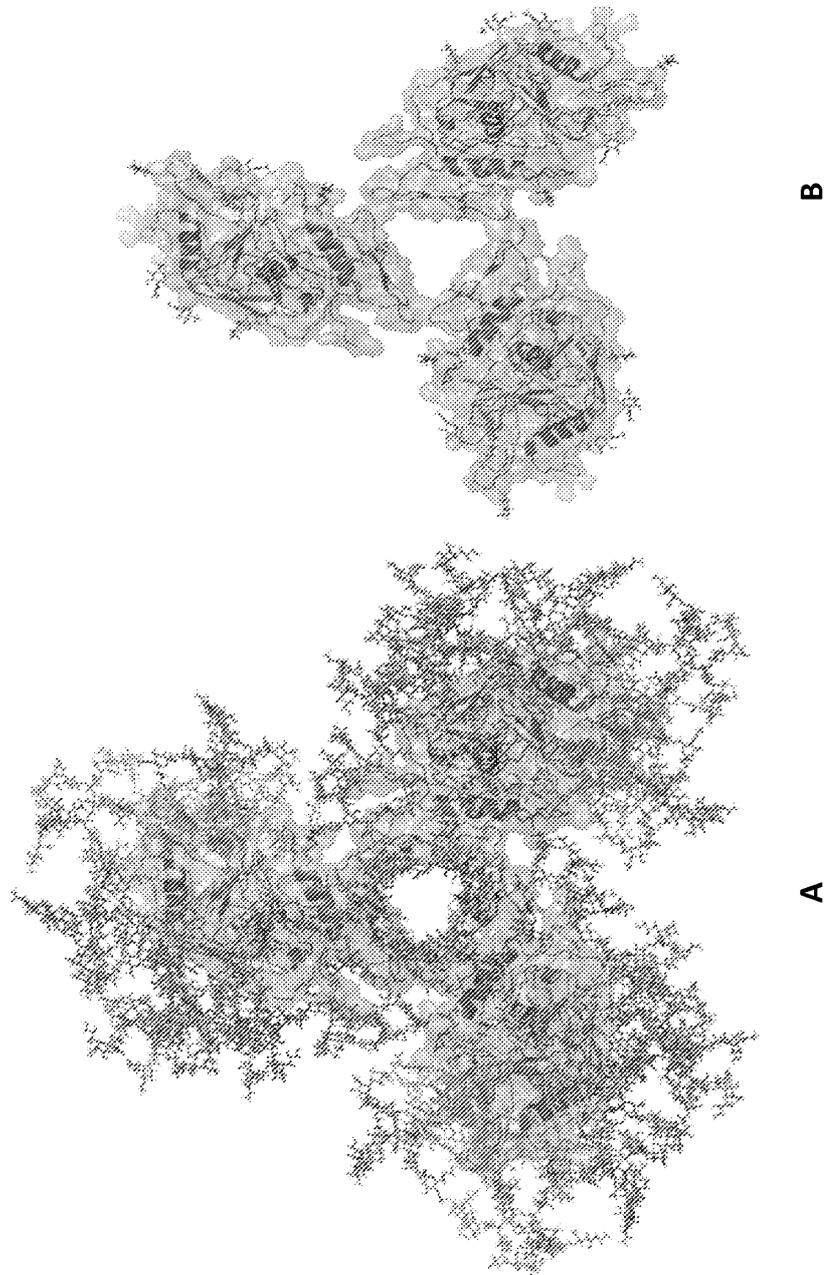


Fig. 20





**Fig. 21**