

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 831 256**

51 Int. Cl.:

C12P 21/06 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01)

A61K 39/145 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.11.2011 PCT/US2011/059449**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2012 WO12061776**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2011 E 11838917 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.10.2020 EP 2635693**

54 Título: **Métodos para la producción de partículas de virus con glicosilación simplificada de proteínas superficiales**

30 Prioridad:

04.11.2010 US 410257 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.06.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**WONG, CHI-HUEY;
MA, CHE y
TSENG, YUNG-CHIEH**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 831 256 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 para la producción de partículas de virus con glicosilación simplificada de proteínas superficiales

La presente invención se refiere a virus, y en particular a la producción de partículas virales con glicanos simplificados. En particular, la presente invención se refiere a la producción de partículas del virus de la gripe con glicosilación simplificada. Específicamente, la invención se refiere a métodos para la producción de partículas de virus de la gripe monoglicosiladas.

La invención se describe aquí en términos de la preparación ejemplar de virus de la gripe monoglicosilados. Se contempla que se pueden usar los mismos métodos para preparar otros virus con estructura de glicano simplificada, incluyendo retrovirus tal como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y flaviviridae tales como el virus del dengue, el virus del Nilo occidental, el virus de la hepatitis C (VHC), y similares.

La gripe es causada por un virus de ARN de la familia de los orthomyxoviridae. Hay tres tipos de estos virus, y causan tres tipos diferentes de gripe: tipo A, B y C. Los virus de tipo A del virus de la gripe infectan a mamíferos (seres humanos, cerdos, hurones, caballos) y aves. Esto es muy importante para la humanidad, ya que es el tipo de virus que ha causado pandemias en todo el mundo. El virus de la gripe de tipo B (también conocido simplemente como gripe B) infecta solo a los seres humanos. Ocasionalmente provoca brotes locales de gripe. Los virus de la gripe C también infectan solo a los seres humanos. Infectan a la mayoría de las personas cuando son jóvenes, y rara vez causan enfermedades graves.

Los virus de la gripe A infectan a una amplia variedad de mamíferos, incluyendo el hombre, los caballos, los cerdos, los hurones, y las aves. El principal patógeno humano, asociado a epidemias y pandemias. Hay al menos 15 serotipos de hemaglutinina (H) conocidos y 9 serotipos de neuraminidasa (N) conocidos. Se cree que los cerdos y las aves son reservorios particularmente importantes, que generan grupos de virus genética y antigénicamente diversos que se transfieren de regreso a la población humana a través del contacto cercano entre seres humanos y animales. Los virus de la gripe B solo infectan a los mamíferos y causan enfermedades, pero generalmente no son tan graves como los de los tipos A. A diferencia de los virus de la gripe A, los virus de la gripe B no tienen serotipos distinguibles. Los virus de la gripe C también infectan solo a los mamíferos, pero rara vez causan enfermedades. Son genética y morfológicamente distintos de los tipos A y B.

Hay 4 antígenos presentes en el virus de la gripe, la hemaglutinina (HA), la neuraminidasa (NA), la nucleocápside (NA), la matriz (M), y las proteínas de la nucleocápside (NP). La NP es un antígeno específico del tipo que se presenta en 3 formas, A, B y C, que proporciona la base para la clasificación de los virus de la gripe humana. La proteína de la matriz (proteína M) rodea la nucleocápside y constituye el 35-45% de la masa de partículas. Dos glicoproteínas de superficie se observan en la superficie como proyecciones en forma de varilla. La hemaglutinina (HA) se sintetiza inicialmente como un precursor trimérico (HA0) que contiene tres cadenas de proteínas idénticas, cada una de las cuales se procesa proteolíticamente en dos subunidades, HA1 y HA2, que se mantienen unidas covalentemente por un solo enlace de disulfuro. HA media la unión del virus al receptor celular. Las moléculas de neuraminidasa (NA) están presentes en cantidades menores en la envoltura. Las cepas humanas circulantes son notorias por su tendencia a acumular mutaciones de un año a otro y causar epidemias recurrentes.

En eucariotas, los restos de azúcar están comúnmente unidos a cuatro restos de aminoácidos diferentes. Estos restos de aminoácidos se clasifican en ligados a O (serina, treonina e hidroxilisina) y enlazados a N (asparagina). Los azúcares ligados a O se sintetizan en el Golgi o en el retículo endoplasmático rugoso (RE) a partir de azúcares nucleotídicos. Los azúcares enlazados a N se sintetizan a partir de un precursor común, y posteriormente se procesan. Se sabe que la adición de cadenas de hidratos de carbono ligadas 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 restos de Asn específicos desempeña un papel importante en la regulación de la actividad, estabilidad o antigenicidad de proteínas maduras de virus (Opdenakker G. et al FASEB Journal 7, 1330-1337 1993). También se ha sugerido que la glicosilación ligada a N es necesaria para el plegamiento, el transporte, la expresión de la superficie celular, la secreción de glicoproteínas (Helenius, A., Molecular Biology of the Cell 5, 253-265 1994), la protección contra la degradación proteolítica, y la 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 proteínas, sino que también brindan protección contra los anticuerpos neutralizantes como un "escudo de glicanos". Como resultado, la selección fuerte específica del hospedante se asocia frecuentemente con posiciones de codones de glicosilación potencial ligada a N. En consecuencia, los sitios de glicosilación enlazados a N tienden a conservarse entre cepas y clados.

Los brotes del virus de la gripe A continúan causando morbimortalidad generalizadas en todo el mundo. Solo en los Estados Unidos de América, se estima que entre el 5 y el 20% de la población es infectada anualmente por el virus de la gripe A, lo que causa aproximadamente 200.000 hospitalizaciones y 36.000 muertes. El establecimiento de políticas integrales de vacunación ha sido una medida eficaz para limitar la morbilidad por gripe. Sin embargo, la deriva genética frecuente del virus requiere una reformulación anual de la vacuna, lo que podría conducir a un desajuste entre la cepa viral presente en la vacuna y la que circula. De este modo, las terapias antivirales contra el virus de la gripe son herramientas importantes para limitar tanto la gravedad de la enfermedad como su transmisión.

Los virus de la gripe H5N1 altamente patógenos han causado brotes en aves de corral y aves silvestres desde 2003 (Li K S et al. (2004) *Nature* 430:209-213). En febrero de 2010, estos virus han infectado no solo a especies de aves sino también a más de 478 seres humanos, de los cuales 286 casos resultaron mortales (www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2010_02_17/en/index.html). Los virus altamente patógenos H5N1 y de la gripe A (H1N1) de origen porcino de 2009 han causado brotes mundiales y han suscitado una gran preocupación por la posibilidad de que se produzcan más cambios en los virus que provoquen una pandemia mortal (Garten R J, 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 seres humanos, convirtiéndose así en una amenaza de pandemia. Por lo tanto, una vacuna contra la gripe debe ser parte integral de cualquier plan de preparación para una pandemia.

Las contribuciones importantes a la comprensión de las infecciones por gripe provienen de los estudios sobre la hemaglutinina (HA), una glicoproteína de la cubierta viral que se une a receptores de glicanos sialilados específicos en el tracto respiratorio, permitiendo que el virus entre 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 RevBiochem* 69:531-569; van Riel D, et al. (2006) *Science* 312:399-399). Para cruzar la barrera de las especies e infectar a la población humana, la HA aviar debe cambiar su preferencia de unión al receptor de un glicano sialilado terminalmente que contiene motivos de ácido siálico ligados a α 2,3 (aviar) a ácido siálico ligados a α 2,6 (humano) (Connor RJ, et al. (1994) *Virology* 205:17-23), y este cambio podría ocurrir 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 glicanos es fundamental para desarrollar métodos para controlar cualquier cepa de gripe cruzada futura que tenga potencial pandémico.

La hemaglutinina (HA) del virus de la gripe es una proteína transmembránica 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). HA es la glicoproteína de la superficie del virión que une el virus a sus receptores en las células hospedantes y fusiona la envoltura viral con las membranas de las vesículas endocíticas para iniciar el proceso infeccioso. (Crecelius D. M., et al. (1984) *Virology* 139, 164-177). También es el componente del virión que estimula la formación de anticuerpos protectores. La naturaleza y el alcance de la glicosilación de la HA se han implicado en la alteración de sus propiedades de unión al receptor y en la aparición de variantes virales con mayor citopatogenicidad (Aytay S., Schulze I. T. (1991) *J. Virol.* 65, 3022-3028) y virulencia (Deshpande K. L., et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 36-40), y en enmascarar sus sitios antigénicos (Skehel J. J., et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 1779-1783). La supresión mutacional de los sitios de glicosilación de HA puede afectar la unión del receptor viral (Gunther I, et al. (1993) *Virus Res* 27:147-160).

La secuencia de aminoácidos de la HA, y por tanto la ubicación de sus sitios de *N*-glicosilación, están determinados por el genoma viral. Las estructuras de estos oligosacáridos parecen estar determinadas por su posición en la HA (Keil W., et al. (1985) *EMBO J.* 4, 2711-2710) y por las enzimas biosintéticas y de recorte proporcionadas por la célula hospedante en la que crece el virus. La plasticidad del genoma viral y la maquinaria de glicosilación especificada del hospedante pueden, juntas, crear poblaciones de virus que son más heterogéneas en estructura y función de las que podrían desarrollarse mediante cualquiera de los procesos por sí solos. Se considera que esta diversidad es responsable de la supervivencia de estos virus y de su capacidad para superar los efectos inhibidores de los anticuerpos neutralizantes y los agentes antivirales.

La HA parece tener regiones que deben estar glicosiladas, otras que deben estar libres de oligosacáridos, y aún otras en las que la glicosilación puede ser ventajosa o perjudicial para la supervivencia del virus. Los sitios de glicosilación en ciertas posiciones en la HA de los virus de la gripe A aislados de diversos animales y seres humanos están altamente conservados, y por lo tanto parecen ser esenciales para la formación y/o mantenimiento de la HA funcional (Gallagher P. J., et al. (1992) *J. Virol.* 66, 7136-7145). Por el contrario, la generación de sitios de glicosilación en ciertas regiones de la HA reduce su transporte a la superficie celular, y su estabilidad y/o función (Gallagher P., et al. (1988) *J. Cell Biol.* 107, 2059-2073). Es en las regiones en las que la glicosilación no está prohibida ni es necesaria para la formación de HA funcional donde la diversidad de oligosacáridos puede tener un efecto selectivo importante, dependiendo del entorno específico en el que se espera que crezca el virus.

Los cambios en la secuencia peptídica en o cerca de los sitios de glicosilación pueden alterar la estructura 3D de HA, y de este modo la especificidad y afinidad de unión al receptor. De hecho, las HA de diferentes subtipos de H5N1 tienen diferentes patrones de unión a glicanos (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). Los cambios en la glicosilación podrían afectar la especificidad y afinidad de unión al receptor, especialmente con respecto a la HA de H5N1 más patógena.

Las regiones menos altamente glicosiladas o no glicosiladas de hemaglutinina continúan mutando para escapar del sistema inmunológico del hospedante. El diseño de la vacuna que usa HA monoglicosilada se describe en la Pub. Sol.

Pat. US nº 2010/0247571 (Wong et al.). De este modo, existe la necesidad de métodos novedosos y eficaces para la producción de partículas de virus de la gripe monoglicosiladas.

5 Wang et al. (2009) PNAS, vol. 106, nº 43, 18137-18142, describen el truncamiento de las estructuras de N-glicano en la glicoproteína hemaglutinina (HA) a las glicofomas monoglicosiladas, y las aplicaciones de tal eliminación para las vacunas contra la gripe.

Karaivanova et al. (1998) Biochem J., Vol. 329, nº 3, 511-518, se refieren a la sulfatación de las glicoproteínas del virus de la gripe, y describen la desglicosilación de las glicoproteínas virales.

SUMARIO DE LA INVENCION

10 La descripción aquí proporciona una demostración ejemplar de la producción de virus de la gripe monoglicosilados. Los métodos descritos son igualmente aplicables a la producción de virus con glicanos simplificados en las proteínas estructurales. Las regiones conservadas de proteínas estructurales con alta glicosilación se pueden seleccionar como dianas para el diseño de vacunas una vez que los patrones de glicosilación presentes en estos sitios se simplifican a regiones mono-, di-, tri- u otras glicosiladas.

15 Específicamente, existe la necesidad de anticuerpos monoclonales de neutralización cruzada que puedan usarse en el diseño y validación de procesos de producción de vacunas que mantengan o mejoren la calidad y antigenicidad de los epítomos de neutralización cruzada en vacunas fabricadas actuales y futuras. Suponiendo que la unión del anticuerpo al antígeno refleja la integridad estructural y el potencial antigénico, se intentaría la unión de anticuerpos de neutralización cruzada, tales como polipéptidos de HA monoglicosilados, y evaluaría cuantitativamente su potencial de neutralización cruzada. Se espera que las vacunas derivadas contra derivados monoglicosilados de HA de la gripe
20 aumenten la inmunogenicidad contra epítomos universales.

25 El antígeno se puede generar eliminando parcialmente los azúcares de la glicoproteína viral para exponer los sitios de glicosilación (que están muy conservados y no mutan o no mutan agresivamente) y al mismo tiempo reteniendo los azúcares adecuados para preservar la estructura terciaria de la glicoproteína. Las glicoproteínas virales parcialmente glicosiladas se pueden generar desglicosilando parcialmente las glicoproteínas de manera que un sitio de glicosilación particular retenga una unidad de azúcar.

La presente invención proporciona un nuevo método para preparar un virus de la gripe desglicosilado. De este modo, la presente invención proporciona un método para producir un virus de la gripe desglicosilado que comprende un antígeno hemaglutinina (HA) y que tiene un único resto de GlcNAc unido a un sitio de N-glicosilación, comprendiendo el método:

- 30 a) cultivar un virus de la gripe que comprende un antígeno hemaglutinina (HA) en un hospedante adecuado en presencia de una cantidad eficaz de un inhibidor de α -manosidasa I, para producir glicoproteínas $\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2$, en el que el hospedante adecuado es un huevo de gallina embrionado libre de patógenos específicos (SPF);
- b) recuperar el virus de la gripe producido en a);
- 35 c) poner en contacto el virus de la gripe recuperado en b) con una endoglicosidasa (Endo H) para producir dicho virus de la gripe desglicosilado; y
- d) aislar el virus de la gripe desglicosilado.

El método según la presente invención puede comprender además producir una composición inmunogénica que comprende el virus de la gripe aislado en la etapa d), que es un virus vivo o un virus inactivado.

40 También se describe aquí una vacuna que comprende al menos una glicoproteína HA parcialmente glicosilada y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La glicoproteína HA parcialmente glicosilada puede seleccionarse del grupo que consiste en virus de la gripe HI, H3 y H5 parcialmente glicosilados.

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 vehículo farmacéuticamente aceptable. La glicoproteína HA desglicosilada puede seleccionarse del grupo que consiste en HI, H3 y H5.

45 La desglicosilación deja una monoglicosilación (queda un azúcar) en uno o más sitios de glicosilación en la glicoproteína.

La inhibición de la α -manosidasa I da como resultado glicoproteínas con $\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2$.

El antígeno HA de la gripe puede comprender un virus de la gripe completo. Todo el virus de la gripe se cultiva en un hospedante de huevo de gallina embrionado libre de patógenos específicos (SPF).

50 Después, se añade kifunensina a la cavidad alantoidea del huevo de gallina embrionado libre de patógenos específicos (SFP).

En algunos aspectos, la kifunensina se añade a una concentración de 0,005 a 0,5 mg/ml.

El antígeno HA del virus de la gripe recuperado se trata con alrededor de 0,1 a alrededor de 100 µg/ml de EndoH.

En algunos aspectos, el virus de la gripe monoglicosilado se aísla mediante un método que comprende ultracentrifugación en gradiente de densidad.

- 5 En algunos aspectos, el método comprende además purificar el antígeno HA del virus de la gripe monoglicosilado mediante un método que comprende ultrafiltración. En algunas realizaciones, la ultrafiltración comprende el uso de un filtro de 0,2 µm.

En algunos aspectos, el método comprende además analizar el virus de la gripe monoglicosilado mediante microscopía electrónica.

- 10 En algunos aspectos, el método comprende además cuantificar el virus de la gripe monoglicosilado mediante un método que comprende el tratamiento con PNGasa. En algunos aspectos, el método comprende además cuantificar el virus de la gripe monoglicosilado mediante un método que comprende electrocromatografía mediante SDS-PAGE.

En algunos aspectos, el método comprende además analizar la composición de glicanos del virus de la gripe monoglicosilado aislado, mediante un método que comprende espectrometría de masas.

- 15 La descripción se refiere a un antígeno HA del virus de la gripe monoglicosilado (virus completo o recombinante) preparado mediante cualquier método descrito aquí.

La descripción se refiere al uso de un antígeno HA del virus de la gripe monoglicosilado (virus completo o recombinante) preparado mediante cualquier método descrito aquí, para la preparación de una vacuna. Estos y otros aspectos resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción de la realización preferida tomada junto con los siguientes dibujos.

- 20

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva, y se incluyen para demostrar aún más ciertos aspectos de la presente descripción, cuyas invenciones pueden entenderse mejor haciendo referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de las realizaciones específicas presentadas aquí. El expediente de patente o solicitud contiene al menos un dibujo ejecutado en color. La Oficina proporcionará copias de esta publicación de patente o de solicitud de patente con dibujo o dibujos en color, previa solicitud y pago de la tasa necesaria.

- 25

La FIGURA 1 muestra la preparación del virus NIBRG-14 monoglicosilado. (Fig. 1A) El virus se cultivó en diferentes concentraciones de inhibidor del procesamiento de N-glicosilación, kifunensina. (Fig. 1B) El virus glicosilado rico en manosa se digirió a virus monoglicosilado mediante una concentración diferente de Endo H. (Fig. 1C) En comparación con el virus completamente glicosilado purificado, el virus monoglicosilado purificado tiene un desplazamiento descendente obvio tanto en HA1 como en HA2. Estas muestras se analizaron mediante análisis de transferencia Western usando un antisero de conejo anti-HA de H5.

- 30

La FIGURA 2 muestra las micrografías electrónicas de virus completamente glicosilados y monoglicosilados. (Fig. 2A) NIBRG-14 completamente glicosilado. (Fig. 2B) NIBRG-14 monoglicosilado. Las partículas de virus se tiñeron con tungstato de metilamina al 2% y se analizaron mediante microscopía electrónica de transmisión.

- 35

La FIGURA 3 muestra la cuantificación de hemaglutinina. La cantidad de hemaglutinina del virus NIBRG-14 se determinó mediante la intensidad de HA1 desglucosilada con PNGasa F en SDS-PAGE.

La FIGURA 4 muestra el análisis de glicopéptidos de hemaglutinina de NIBRG-14 monoglicosilado. (Fig. 4A) Los sitios de glicosilación de hemaglutinina de NIBRG-14 están marcados con números de restos de aminoácidos. La estructura se creó con el código PDB 1j5m, y el sitio de glicosilación se coloreó en rojo. (Fig. 4B) Análisis de glicopéptidos de hemaglutinina de NIBRG-14 monoglicosilado. Después de la digestión con Endo H, la mayoría de los sitios de glicosilación están monoglicosilados, excepto que los sitios de glicosilación 295 y 489 todavía están parcialmente (<10%) glicosilados con alto contenido en manosa.

- 40

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Los términos usados en esta memoria descriptiva generalmente tienen sus significados ordinarios en la técnica, dentro del contexto de la invención, y en el contexto específico en el que se usa cada término. Ciertos términos que se usan para describir la invención se analizan a continuación, o en otra parte de la memoria descriptiva, para proporcionar una guía adicional al médico con respecto a la descripción de la invención. Por conveniencia, se pueden resaltar ciertos términos, por ejemplo, usando cursiva y/o comillas. El uso del resalte no influye en el alcance y el significado de un término; el alcance y el significado de un término es el mismo, en el mismo contexto, esté o no resaltado. Se apreciará que se puede decir lo mismo en más de una forma.

- 50

En consecuencia, se pueden usar un lenguaje alternativo y sinónimos para uno o más de los términos discutidos aquí, ni se le debe dar ningún significado especial a si un término se elabora o analiza aquí. Se proporcionan sinónimos para ciertos términos. Un recital de uno o más sinónimos no excluye el uso de otros sinónimos. El uso de ejemplos en cualquier parte en esta memoria descriptiva, incluyendo ejemplos de cualquier término discutido aquí, es ilustrativo.

5 A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados aquí tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. En caso de conflicto, prevalecerá el presente documento, incluyendo las definiciones. Las siguientes referencias proporcionan a un experto una definición general de muchos de los términos usados en esta invención: Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2ª Ed. 1993); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., Cambridge University Press. 1990); The Glossary of Genetics, 5ª ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991); y Hale y Margham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991).

10 Generalmente, las nomenclaturas utilizadas en relación con, y técnicas de, cultivo de células y tejidos, biología molecular y química e hibridación de proteínas y oligo- o polinucleótidos descritas aquí son las bien conocidas y comúnmente usadas en la técnica. Se usan técnicas estándar para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos, y cultivo y transformación de tejidos (por ejemplo, electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se realizan según las especificaciones del fabricante o como se logra comúnmente en la técnica o como se describe aquí. La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique específicamente lo contrario, métodos convencionales de virología, inmunología, microbiología, biología molecular, y técnicas de ADN recombinante dentro del conocimiento de la técnica, muchos de los cuales se describen a continuación con el fin de ilustración. Estas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, Sambrook, et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª Edición, 1989); Maniatis et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982); DNA Cloning: A Practical Approach, vol. I & II (D. Glover, ed.); Oligonucleotide Synthesis (N. Gait, ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization (B. Hames & S. Higgins, eds., 1985); Transcription and Translation (B. Hames & S. Higgins, eds., 1984); Animal Cell Culture (R. Freshney, ed., 1986); Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984).

15 Las expresiones “subtipo de gripe A” o “subtipo de virus de gripe A” se usan indistintamente, y se refieren a variantes del virus de gripe A que se caracterizan por una proteína de superficie viral hemaglutinina (H), y de este modo están marcadas con un número H, tal como, por ejemplo, H1, H3 y H5. Además, los subtipos pueden caracterizarse adicionalmente por una proteína de superficie viral neuraminidasa (N), indicada por un número N, tal como, por ejemplo, N1 y N2. Como tal, se puede hacer referencia a un subtipo mediante números H y N, tal como, por ejemplo, H1N1, H5N1 y H5N2. Los términos incluyen específicamente todas las cepas (incluyendo las cepas extintas) dentro de cada subtipo, que generalmente son el resultado de mutaciones y muestran diferentes perfiles patogénicos. Tales cepas también se denominarán como diversos “aislados” de un subtipo viral, incluyendo todos los aislados pasados, presentes y futuros. Por consiguiente, en este contexto, los términos “cepa” y “aislado” se usan indistintamente. Los subtipos contienen antígenos basados en un virus de gripe A. Los antígenos pueden basarse en una proteína de superficie vírica de hemaglutinina, y pueden designarse como “antígeno HA”. En algunos casos, tales antígenos se basan en la proteína de un subtipo particular, tal como, por ejemplo, un subtipo H1 y un subtipo H5, que pueden denominarse antígeno H1 y antígeno H5, respectivamente.

20 Como se usa en la presente descripción, el término proteína “desglicosilada” o “parcialmente glicosilada” denota una proteína que tiene uno o más azúcares eliminados de la estructura de glicano de una instancia completamente glicosilada 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 que el proceso de desglicosilación deja una monoglicosilación, una diglicosilación o una triglicosilación en uno o más sitios de glicosilación presentes en la glicoproteína.

25 Una proteína “parcialmente glicosilada” incluye una proteína “desglicosilada” en la que se retienen uno o más azúcares en cada sitio de glicosilación, y cada sitio de glicosilación parcial contiene una estructura de glicano más pequeña (que contiene menos unidades de azúcar) en comparación con el sitio en una instancia completamente glicosilada de la glicoproteína, y la proteína parcialmente glicosilada retiene sustancialmente su conformación/plegamiento nativo. Una proteína “parcialmente glicosilada” se genera por desglicosilación parcial de la estructura de glicano de al menos un sitio de glicosilación de una instancia completamente glicosilada de la glicoproteína. Una proteína “parcialmente glicosilada” también se genera introduciendo 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 una instancia completamente glicosilada de la glicoproteína. Una proteína “parcialmente glicosilada” también se genera sintetizando una secuencia de glicoproteína viral, o un fragmento de la misma, introduciendo unidades de aminoácidos glicosilados (por ejemplo, restos 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 una instancia completamente glicosilada de la glicoproteína.

30 La transmisión viral comienza con una interacción crítica entre la glicoproteína hemaglutinina (HA), que se encuentra en la capa viral de la gripe, y los glicanos que contienen ácido siálico (SA), que se encuentran en la superficie de la célula hospedante. Para dilucidar el papel de la glicosilación de HA en esta importante interacción, se prepararon diversas glicofomas de HA definidas, y se estudiaron su afinidad y especificidad de unión mediante el uso de una

micromatriz de SA sintética. El truncamiento de las estructuras de N-glicanos en HA aumentó las afinidades de unión de SA mientras que disminuyó la especificidad hacia ligandos de SA dispares. La contribución de cada grupo monosacárido y sulfato dentro de las estructuras del ligando SA a la energía de unión a HA se diseccionó cuantitativamente. Se encontró que el grupo sulfato añade casi 100 veces (2,04 kcal/mol) en energía de unión a HA completamente glicosilado, y también lo hace el glicano biantenarico a la glicofoma HA monoglicosilada. Los anticuerpos producidos contra la proteína HA que portan solo una única GlcNAc ligada a N en cada sitio de glicosilación mostraron una mejor afinidad de unión y actividad de neutralización contra los subtipos de gripe que los HA completamente glicosilados provocados. De este modo, la eliminación de glicanos estructuralmente no esenciales en glicoproteínas de la superficie viral es un enfoque general y muy eficaz para el diseño de vacunas contra la gripe y otros virus humanos.

La glicosilación de polipéptidos está típicamente ligada a N u O. Ligado a N se refiere a la unión del resto de hidrato de carbono a la cadena lateral de un resto 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. Este es un polisacárido ligado a la proteína a través del átomo de nitrógeno en la cadena lateral de la asparagina (Asn). Un sequon es Asn-X_{aa}-Ser o Asn-X_{aa}-Thr, en el que X_{aa} es cualquier aminoácido excepto prolina. De este modo, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptidos en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La glicosilación ligada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa a un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, aunque también se puede usar 5-hidroxi prolina o 5-hidroxilisina. Mientras que 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 da como resultado la glicosilación, y algunos sequones en las glicoproteínas pueden permanecer sin glicosilar. (Curling EM, et al., Biochemical Journal 272, 333-337 1990).

Inhibidores de glicosidasas

El glicósido hidrolasas (también llamadas glicosidasas o glicosil hidrolasas) catalizan la hidrólisis del enlace glicosídico para liberar azúcares más pequeños. Son enzimas comunes con funciones en la naturaleza que incluyen la degradación de la biomasa, tales como la celulosa y la hemicelulosa, en estrategias de defensa antibacteriana (por ejemplo, lisozima), en los mecanismos de patogénesis (por ejemplo, neuraminidasas virales) y en la función celular normal (por ejemplo, el recorte de manosidasas implicadas en la biosíntesis de glicoproteínas ligadas a N). Junto con las glicosiltransferasas, las glicosidasas forman la principal maquinaria catalítica para la síntesis y ruptura de enlaces glicosídicos. Se describen aquí ejemplos de inhibidores de la glicosilación incluyen kinefusina, australina, castanospermina, desoxinogirimicina, desoximanojirimicina, swainsonina, manostatina A, y similares.

En la presente invención se usa una clase específica de inhibidor, los inhibidores de la α manosidasa I. Australina es un alcaloide de pirrolizidina polihidroxilado que es un buen inhibidor de la alfa-glucosidasa amiloglucosidasa (50% de inhibición a 5,8 microM), pero no inhibe la beta-glucosidasa, alfa- o beta-manosidasa, o alfa- o beta-galactosidasa. La castanospermina es un alcaloide de indolizina que inhibe las actividades de la alfa-glucosidasa y altera la distribución del glucógeno. La castanospermina inhibe la infección por el virus del dengue (Whitby K et al, J Virol. julio 2005; 79(14): 8698-8706).

La biosíntesis de los diversos tipos de estructuras de oligosacáridos enlazados a N implica dos series de reacciones: 1) la formación del precursor del sacárido ligado a lípidos, Glc₃Man₉(GlcNAc)₂-pírofosforil-dolicol, mediante la adición por etapas de GlcNAc, manosa y glucosa a dolicol-P; y 2) la eliminación de glucosa y manosa por glicosidasas unidas a la membrana y la adición de GlcNAc, galactosa, ácido siálico y fucosa por glicosiltransferasas localizadas en el Golgi para producir diferentes estructuras complejas de oligosacáridos.

El uso de inhibidores que bloquean las reacciones de modificación en diferentes etapas, hace que la célula produzca glicoproteínas con estructuras de hidrato de carbono alteradas. Se han identificado varios compuestos de tipo alcaloide que son inhibidores específicos de las glucosidasas y manosidasas implicadas en el procesamiento de las glicoproteínas. Estos compuestos provocan la formación de glicoproteínas con estructuras ricas en manosa que contienen glucosa, o diversas cadenas ricas en manosa o cadenas híbridas, según el sitio de inhibición. (Elbein AD FASEB J. 1991 Dec; 5(15):3055-3063).

Las primeras cuatro enzimas que funcionan en el procesamiento de glicoproteínas ligadas a N son glicosidasas. La GlcNAc-fosfotransferasa cataliza la primera etapa en la síntesis del determinante manosa 6-fosfato. Una estructura de hidratos de carbono adecuada facilita enormemente la fosforilación eficaz por GlcNAc-fosfotransferasa. La estructura de hidratos de carbono acoplada a la fosforilación es necesaria para la síntesis de una señal de manosa-6-fosfato en la molécula de GAA que es un N-glicano rico en manosa.

Se conocen varios inhibidores del procesamiento de manosidasa. Se mostró que la swainsonina, aislada de plantas productoras, es un potente inhibidor de la manosidasa II de Golgi, pero no tiene efecto sobre manosidasa I (James, L. F., Elbein, A. D., Molyneux, R. J., y Warren, C. D. (1989) Swainsonine and related glycosidase inhibitors. Iowa State Press, Ames, Iowa). La desoximanojirimicina es un inhibidor bastante potente de la manosidasa I de hígado de rata. En células intactas, la desoximanojirimicina bloqueó la síntesis de tipos complejos de oligosacáridos enlazados a N y provocó la acumulación de glicoproteínas que tienen estructuras de Man₇₋₉(GlcNAc)₂, predominando los oligosacáridos

$\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2$ (Elbein, A. D., et al. (1984) Arch. Biochem. Biophys. 235, 579-588). La manostatina A es un metabolito producido por el microorganismo *Streptovorticillium verticillus*, y se dio a conocer que este compuesto era un potente inhibidor de la α -manosidasa del epidídimo de rata. (Aoyagi, T., et al. (1989) J. Antibiot. 42, 883-889).

5 Kifunensina (Kif) se aisló por primera vez del actinomiceto *Kitasatosporia kifunense* No. 9482 (M. Iwami, O. et al. J. Antibiot., 40, 612, 1987), y es un derivado de oxamida cíclica de 1-amino-manojirimicina. La kifunensina inhibe la enzima de Golgi animal manosidasa I. Cuando se añade kifunensina a células de mamífero cultivadas, en concentraciones de 1 $\mu\text{g/ml}$ o más, provoca un cambio completo en la estructura de los oligosacáridos enlazados a N de cadenas complejas a estructuras de $\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2$, según su inhibición de manosidasa I. Por otro lado, la desoximanojirimicina, incluso a 50 $\mu\text{g/ml}$, no previene la formación de todas las cadenas complejas (Elbein, A. D., et al. (1990) Kifunensine, a potent inhibitor of the glycoprotein processing mannosidase I. J Biol. Chem. 265, 15599-15605). De este modo, la kifunensina es uno de los inhibidores del procesamiento de glicoproteínas más eficaces.

15 La kifunensina también ha mostrado una actividad inmunomoduladora prometedora en la inhibición de la α -manosidasa. La síntesis de kifunensina se ha dado a conocer tanto por Fujisawa Pharmaceutical Co. (H. Kayakiri, et al., Tetrahedron Lett., 31, 225, 1990; H. Kayakiri, et al., Chem. Pharm. Bull., 39, 1392, 1991) como por Hudlicky et al. (J. Rouden and T. Hudlicky, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 1095, 1993; J. Rouden, T. et al., J. Am. Chem. Soc., 116, 5099, 1994).

20 El tratamiento de las células con kifunensina (Kif) da como resultado la inhibición del procesamiento de glicoproteínas en esas células (Elbein et al (1991) FASEB J (5):3055-3063; y Bischoff et al (1990) J. Biol. Chem. 265(26):15599-15605). Kif bloquea la unión del azúcar complejo a las proteínas modificadas. Sin embargo, si se utiliza suficiente Kif para inhibir completamente el procesamiento de glicoproteínas en hidrolasas lisosomales, las hidrolasas resultantes tienen estructuras de manosa-9, que no son los sustratos más eficientes para la enzima GlcNAc fosfotransferasa.

En algunos de los métodos descritos aquí, se añade a las células un inhibidor de la glicosidasa, tal como Kif, en una cantidad de al menos 0,01 $\mu\text{g/ml}$ a alrededor de al menos 500 $\mu\text{g/ml}$, incluyendo 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5, 1,75, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,25, 9,5, 9,75, y todos los valores entre ellos.

25 La kifunensina inhibe la función de la enzima α -manosidasa I en la ruta de N-glicosilación, y produce glicoproteínas con composiciones de $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$.

30 Los niveles y/o tipos de estructuras de hidratos de carbono complejas se pueden medir usando métodos conocidos. Por ejemplo, las glicoproteínas y sus oligosacáridos asociados se pueden caracterizar usando endoglicosidasas para diferenciar entre oligosacáridos ricos en manosa y oligosacáridos de tipo complejo (Maley et al (1989) Anal. Biochem. 180:195-204). La péptido- N_4 -(N-acetil-1- β -glucosaminil)asparagina amidasa (PNGasaF) es capaz de hidrolizar oligosacáridos ligados a asparaginas (ligados a N) en el enlace de β -aspartilglicosilamina para producir amoníaco, ácido aspártico y un oligosacárido con un di-N-acetilquitobiosa intacta en el extremo reductor. La especificidad de PNGasa es amplia debido a que los oligosacáridos ricos en manosa, híbridos, di-, tri- y tetraantenarios complejos, sulfatados y polisialilados son sustratos. Además, la endo- β -N-acetilglucosaminidasa H (EndoH) hidroliza eficazmente la unidad de quitobiosa en oligosacáridos enlazados a N híbridos y que contienen manosa que poseen al menos tres restos de manosa, siempre que el brazo de α -1,6-manosa tenga otra manosa unida. Los oligosacáridos complejos son resistentes a la digestión con EndoH.

40 Para caracterizar el tipo de oligosacáridos enlazados a N presentes en las glicoproteínas, se puede digerir una alícuota de proteína con PNGasaF (0,5% de SDS, 1% de β -mercaptoetanol, 50 mM de NP-40, 50 mM de fosfato de sodio, pH 7,5) o EndoH (0,5% de SDS, 1% de β -mercaptoetanol, 50 mM de citrato de sodio, pH 5,5) en condiciones reductoras. Las proteínas nativas y digeridas se analizan entonces mediante electroforesis en SDS-poliacrilamida en condiciones reductoras, y se comparan las movilidades relativas. Si la glicoproteína contiene solo oligosacáridos ricos en manosa, las muestras tratadas con PNGasaF y EndoH tendrán una mayor movilidad que la proteína no tratada. La proteína tratada con EndoH tendrá un peso molecular ligeramente superior debido a la única N-acetilglucosamina que queda en cada sitio de glicosilación enlazado a N. Si una glicoproteína contiene solo oligosacáridos complejos, la proteína tratada con EndoH no tendrá un cambio en la migración en comparación con la proteína no tratada. Si hay oligosacáridos tanto complejos como ricos en manosa, entonces la proteína tratada con EndoH será más pequeña que la glicoproteína no tratada pero más grande que la proteína tratada con PNGasaF. La diferencia será mayor que la que puede ser explicada por la N-acetilglucosamina que queda.

50 Para generar los glicanos simplificados en las glicoproteínas diana, se usan endoglicosidasas. Una endoglicosidasa es una enzima que libera oligosacáridos de glicoproteínas o glicolípidos. O simplemente escinde cadenas de polisacáridos entre restos que no son el resto terminal, aunque es más común la liberación de oligosacáridos de moléculas conjugadas de proteínas y lípidos. Rompe los enlaces glicosídicos entre dos monómeros de azúcar en un polímero. Los ejemplos de endoglicosidasas incluyen, pero no se limitan a, endoglicosidasa D, endoglicosidasa F, endoglicosidasa F1, endoglicosidasa F2, endoglicosidasa H y endoglicosidasa S.

55

Preparación del virus de la gripe monoglicosilado

5 Para producir proteínas con glicoproteínas ricas en manosa, las células que albergan el virus de la gripe se exponen a Kif (y/o DMJ) para inhibir el procesamiento de las glicoproteínas. Para producir el virus de la gripe monoglicosilado, el virus se inyecta en la cavidad alantoidea de huevos de gallina embrionados libres de patógenos con inhibidores de manosidasa, tal como la kifunensina.

La kifunensina inhibe la función de la enzima α -manosidasa I en la ruta de N-glicosilación y da como resultado glicoproteínas con composiciones de $\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2$. La concentración de kifunensina en la inhibición de la glicosilación de hemaglutinina oscila entre 5, 10, 25, 50, 75, 100, 200, 500 $\mu\text{g/ml}$ y hasta 500 $\mu\text{g/ml}$, y todos los valores entre ellos.

10 Después de alrededor de 1-3 días de incubación, el líquido alantoideo tratado con kifunensina se cosecha y se digiere con endoglicosidasa (Endo H) para eliminar los glicanos de tipo ricos en manosa, es decir, concentraciones capaces de convertirse de $\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2$ a GlcNAc simple. La concentración de Endo H en el líquido alantoideo para producir hemaglutinina monoglicosilada oscila al menos alrededor de 0,1, 0,5, 1, 2, 5, 7, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 75, 100, 150, 200, 500 o más $\mu\text{g/ml}$ de líquido alantoideo.

15 Posteriormente, el virus monoglicosilado se recupera y se purifica.

Uso de virus de la gripe monoglicosilado

20 Los antígenos del virus de la gripe monoglicosilados descritos aquí se pueden usar para inmunizar contra la infección por el virus de la gripe. El virus específico del que derivan los antígenos puede ser el mismo o diferente del virus específico para el que se proporciona protección, debido a que se sabe que se produce protección cruzada entre diferentes aislados con los virus de la gripe, particularmente dentro de los mismos subtipos virales.

25 Las vacunas contra la gripe que se usan actualmente se denominan vacuna de virus completo (WV) o subvirión (SV) (también denominada "antígeno de superficie dividido" o "purificado"). La vacuna WV contiene virus inactivado intacto, mientras que la vacuna SV contiene virus purificado interrumpido con detergentes que solubilizan la envoltura viral que contiene lípidos, seguido de la inactivación química del virus residual. También se están desarrollando vacunas virales atenuadas contra la gripe. Se puede encontrar una discusión sobre los métodos de preparación de vacunas convencionales en Wright, P. F. y Webster, R. G., *FIELDS VIROLOGY*, 4^a Ed. (Knipe, D. M. et al. Ed.), 1464-65 (2001).

30 Cuando una vacuna incluye más de una cepa de gripe, las diferentes cepas generalmente se cultivan por separado y se mezclan después de que se hayan recolectado los virus y se hayan preparado los antígenos. Alternativamente, se pueden combinar diferentes segmentos de diferentes aislados del virus de la gripe para generar una vacuna multipotente. El o los virus de la gripe usados en los procedimientos de la invención pueden ser cepas reagrupadas, y/o pueden haberse obtenido mediante técnicas de genética inversa. El o los virus pueden estar atenuados. El o los virus pueden ser sensibles a la temperatura. El o los virus pueden estar adaptados al frío. Puede usarse una cepa reordenada que incluya los segmentos virales HA y/o NA de una cepa patógena y los seis o siete segmentos restantes de una cepa no patógena.

35 El antígeno del virus de la gripe usado en la composición inmunogénica según la descripción puede estar en forma de un virus vivo o, preferiblemente, un virus inactivado. La inactivación del virus normalmente implica el tratamiento con una sustancia química tal como formalina o β -propiolactona. Cuando se usa un virus inactivado, el antígeno puede ser un virus completo, un virus dividido, o subunidades virales. Los virus divididos se obtienen tratando viriones con detergentes (por ejemplo, éter etílico, polisorbato 80, desoxicolato, fosfato de tri-N-butilo, Triton X-100, Triton N101, bromuro de cetiltrimetilamonio, etc.) para producir preparaciones de subviriones. Las vacunas de subunidades comprenden uno o ambos de los antígenos de superficie de la gripe hemaglutinina y neuraminidasa. Los antígenos de la gripe también se pueden presentar en forma de virosomas.

45 Las composiciones inmunogénicas y medicamentosas de la descripción son adecuadas para la administración a un paciente. Esto se puede lograr de diversas formas, que incluyen, pero no se limitan a: inyección intradérmica; administración transdérmica; y administración tópica. Estos se pueden usar junto con la abrasión de la piel, por ejemplo, con papel de lija o con microabrasivos.

50 Las composiciones inmunogénicas y medicamentosas de la descripción se presentan preferiblemente como vacunas. Las composiciones de la invención pueden incluir un adyuvante. Los adyuvantes que se han usado en las vacunas contra la gripe incluyen sales de aluminio, quitosano, oligodesoxinucleótidos CpG tal como CpG 7909, emulsiones de aceite en agua tal como MF59, emulsiones de agua en aceite en agua, toxina termolábil de *E. coli* y su mutantes desintoxicados, monofosforil lípido A y su derivado 3-O-desacilado, mutantes de la toxina de pertussis, dipéptidos de muramilo, etc.

EJEMPLOS

55 A continuación, se dan ejemplos de instrumentos, aparatos, métodos y sus resultados relacionados según las realizaciones de la presente invención.

EJEMPLO 1: Preparación de los virus completamente glicosilados y monoglicosilados

El virus de la gripe A, NIBRG-14 (H5N1) (Nicolson C, et al. (2005) *Vaccine* 23(22):2943-2952), se inyectó (1000 TCID50 (dosis infecciosa de cultivo de tejidos al 50%) en 200 µl de PBS) en la cavidad alantoidea de huevos de gallina embrionados libres de patógenos específicos (SPF) de 10 días de edad para producir el virus ordinario completamente glicosilado (WHO (2005) WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance. (Organización Mundial de la Salud, Ginebra)).

Para producir virus monoglicosilado, el virus se inyectó en la cavidad alantoidea con 0,2 mg/ml de kifunensina (Cayman Chemical). La kifunensina inhibe la función de la enzima α -manosidasa I en la ruta de N-glicosilación, y da como resultado glicoproteínas con composiciones de Man9GlcNAc2 (Elbein AD, et al. (1990) *J Biol Chem* 265(26):15599-15605).

Se analizó la dependencia de la concentración de kifunensina para inhibir la glicosilación de hemaglutinina (Fig. 1A). Después de 3 días de incubación, se recogió el líquido alantoideo y se centrifugó para eliminar los desechos durante 10 min a 3.000 g. El líquido alantoideo tratado con kifunensina se digirió entonces con endoglicosidasa Endo H (20 µg por ml de líquido alantoideo) durante 12 horas a 4°C para eliminar los glicanos de tipo ricos en manosa, es decir, de Man9GlcNAc2 a GlcNAc simple. Se analizó la dependencia de la concentración de Endo H en el líquido alantoideo para producir hemaglutinina monoglicosilada (Fig. 1B).

Posteriormente, el virus monoglicosilado se peletizó mediante ultracentrífuga durante 90 min a 46.000 g, se resuspendió con PBS y se purificó mediante un gradiente de densidad de sacarosa discontinuo (25%, 40%) durante 90 min a 270.000 g. El virus en el gradiente se recogió y se peletizó mediante ultracentrífuga durante 90 min a 120.000 g. Finalmente, el pelete se resuspendió en PBS y se filtró con un filtro de 0,22 µm (CDC (1982) *Concepts and Procedures for Laboratory-based Influenza Surveillance* (U.S. Dept. of Health and Human Services., Washington, DC); Harvey R, et al. (2008) *Vaccine* 26(51):6550-6554). En comparación con el virus totalmente glicosilado purificado, el virus monoglicosilado purificado presenta cambios descendentes evidentes tanto en HA1 como en HA2 (Fig. 1C).

EJEMPLO 2: Análisis de microscopía electrónica de los virus completamente glicosilados y monoglicosilados

La disolución de virus se colocó sobre la superficie recubierta de colodión-carbono de una rejilla de cobre (Electron Microscopy Sciences). El exceso de líquido se eliminó con papel de filtro, y se añadió tungstato de metilamina al 2% (Ted Pella, Inc.) para teñir durante 30 segundos. El exceso de líquido se eliminó con papel de filtro, y se lavó con H₂O durante 30 segundos. Después, la rejilla se secó al aire durante 4 horas, y las partículas de virus se fotografiaron mediante microscopía electrónica de transmisión (Hitachi H-7000). Los virus de la gripe NIBRG-14 completamente glicosilados y monoglicosilados son similares en tamaño y morfología (Fig. 2).

EJEMPLO 3: Cuantificación de hemaglutinina en el virus

El virus se mezcló con amortiguador de desnaturalización (5% de SDS y 10% de β -mercaptoetanol) y se hirvió durante 10 min, la muestra se añadió después a 10% de NP-40 y se trató con PNGasa F (New England Biolabs) a 25°C durante la noche. La muestra se mezcló con amortiguador de muestra de SDS-PAGE y se calentó hasta 95°C durante 10 min antes de cargarla en el gel. El gel se tiñó con SYPRO RUBY® (Invitrogen) y se analizó mediante el sistema de imagen VERSA DOC® (Bio-rad). El tratamiento de PNGasa F antes del análisis mediante SDS-PAGE es para separar la proteína HA1 de la NP en la muestra de virus completamente glicosilado. Esto permite la comparación de intensidad directa de proteínas HA1 de virus tanto completamente glicosilados como monoglicosilados en SDS-PAGE para la cuantificación de hemaglutinina en el virus (Fig. 3).

EJEMPLO 4: Análisis de glicopéptidos con LC-MS-MS

Se usó espectrometría de masas para analizar la composición de glicanos del virus monoglicosilado. La disolución de virus se mezcló con amortiguador de muestra no reductor y se calentó hasta 95°C durante 10 min antes de cargarla al gel. El gel se tiñó con azul de Coomassie. La banda de HA0 se cortó en trozos pequeños para la digestión trípica con tripsina en gel. Después de la digestión, la muestra se analizó mediante LC-MS-MS (Wu Y, et al. (2010) *Rapid Commun Mass Spectrom* 24(7):965-972) (Agilent Technologies, Thermo Scientific). Hay seis sitios de N-glicosilación del virus de la gripe NIBRG-14. Excepto por un pequeño porcentaje de presencia de glicanos de tipo ricos en manosa en el resto 295 (-10% de Man₆(GlcNAc)₂) y en el resto 489 (-10% Man₇₋₉(GlcNAc)₂), todos los demás glicanos están monoglicosilados con un solo resto de sacárido GlcNAc unido (Fig. 4).

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un virus de la gripe desglicosilado que comprende un antígeno hemaglutinina (HA) y que tiene un solo resto de GlcNAc unido a un sitio de N-glicosilación, comprendiendo el método:
 - 5 a) cultivar un virus de la gripe que comprende un antígeno hemaglutinina (HA) en un hospedante adecuado en presencia de una cantidad eficaz de un inhibidor de α -manosidasa I, para producir glicoproteínas $\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2$, en el que el hospedante adecuado es un huevo de gallina embrionado libre de patógenos específicos (SPF);
 - b) recuperar el virus de la gripe producido en a);
 - c) poner en contacto el virus de la gripe recuperado en b) con una endoglicosidasa (Endo H) para producir dicho virus de la gripe desglicosilado; y
 - 10 d) aislar el virus de la gripe desglicosilado.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el virus de la gripe es un virus de la gripe H5N1.
3. El método de la reivindicación 1, en el que el virus de la gripe es NIBRG-14.
4. El método de la reivindicación 1, en el que el inhibidor de manosidasa es kifunensina (Kif) o desoximanojirimicina (DMJ).
- 15 5. El método de la reivindicación 1, en el que la kifunensina se añade a la cavidad alantoidea del huevo de gallina embrionado libre de patógenos específicos (SPF) a una concentración de 0,005 a 0,5 mg/ml.
6. El método de la reivindicación 5, en el que la etapa (b) se realiza mediante un procedimiento que comprende:
 - incubar el huevo de gallina embrionado libre de patógenos específicos (SPF) durante un tiempo suficiente para hacer crecer el virus de gripe HA, y
 - 20 aislar el líquido alantoideo del huevo de gallina embrionado SPF específico, comprendiendo el líquido el virus de la gripe.
7. El método de la reivindicación 6, en el que el virus de la gripe recuperado en la etapa (b) se trata con 0,1 a 100 $\mu\text{g/ml}$ de Endo H para producir dicho virus de la gripe desglicosilado.
- 25 8. El método de la reivindicación 6, en el que el virus de la gripe se aísla mediante un método que comprende ultracentrifugación en gradiente de densidad.
9. El método de la reivindicación 1, que comprende además (c) purificar el virus de la gripe aislado en la etapa (d) mediante un método que comprende ultrafiltración.
10. El método de la reivindicación 9, en el que la ultrafiltración comprende el uso de un filtro de 0,2 μm .
- 30 11. El método de la reivindicación 1, que comprende además cuantificar el virus de la gripe aislado en la etapa (d) mediante (i) un método que comprende el tratamiento con PNGasa, o (ii) un método que comprende electrocromatografía mediante SDS-PAGE.
12. El método de la reivindicación 1, que comprende además analizar una composición de glicanos del virus de la gripe aislado en la etapa (d) mediante un método que comprende espectrometría de masas.
- 35 13. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-12, en el que el virus de la gripe se selecciona del grupo que consiste en el virus de la gripe H1, H3 y H5.
14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que el método comprende además producir una composición inmunogénica que comprende el virus de la gripe aislado en la etapa d), que es un virus vivo o un virus inactivado.
15. El método de la reivindicación 14, en el que la composición inmunogénica comprende además un adyuvante.
- 40

Figura 1

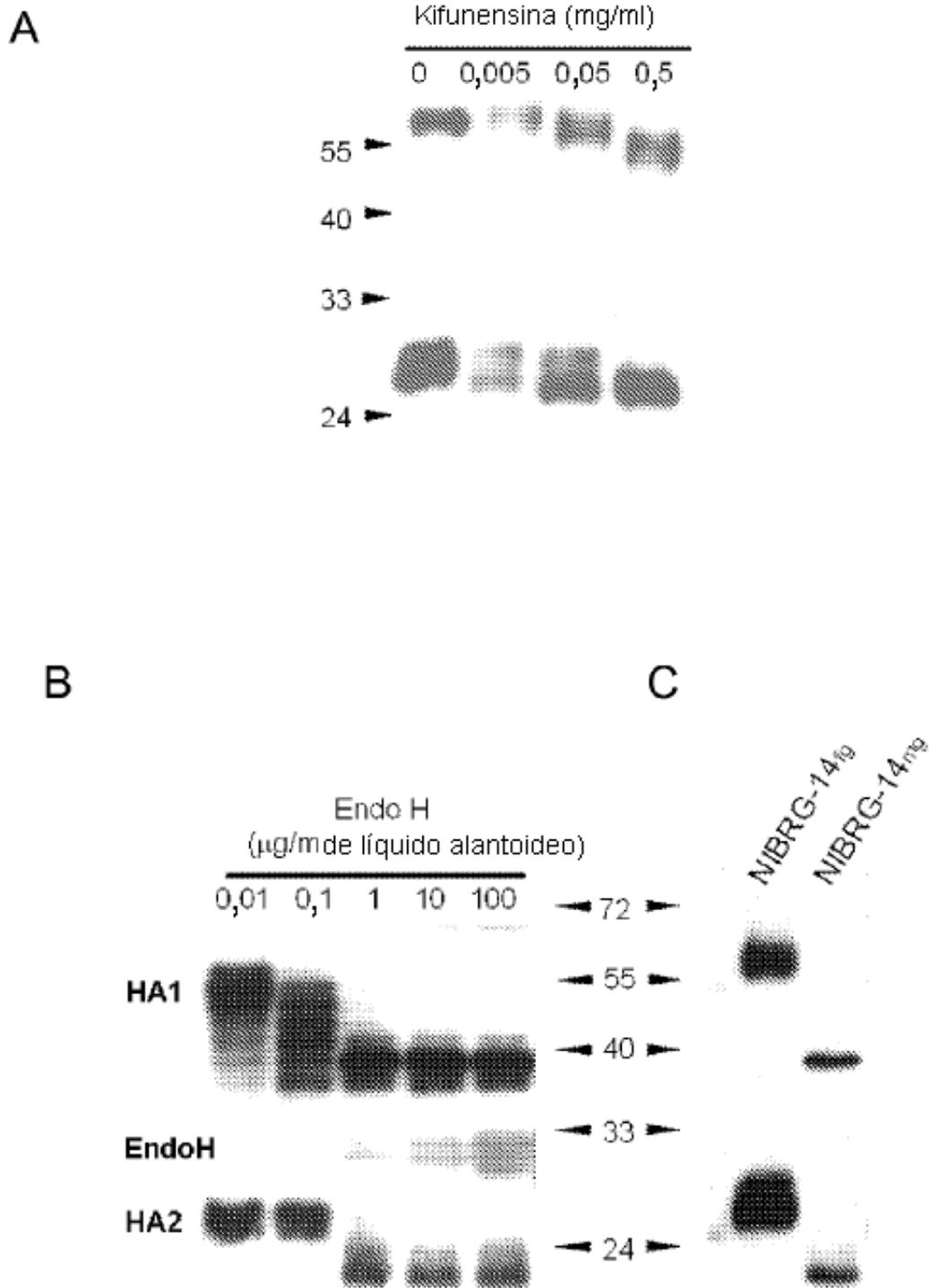
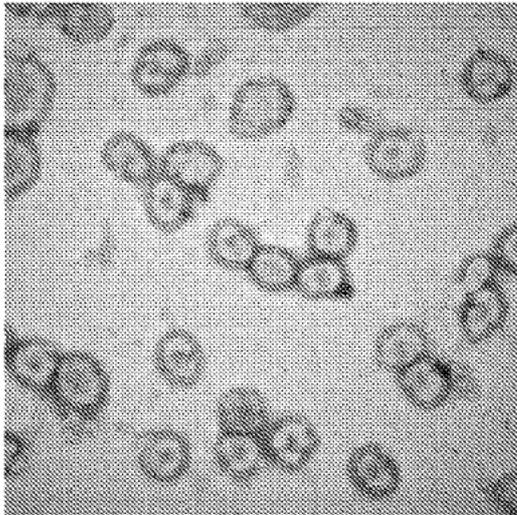


Figura 2

A

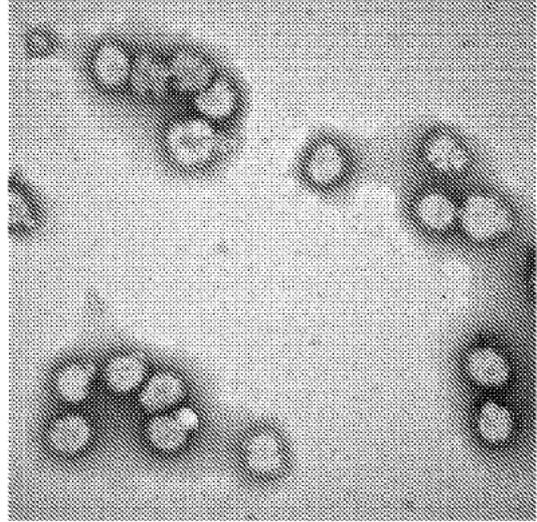
NIBRG-14_{fg}



Fg106-7.jpg
E0 30s
Print Mag: 35400x @ 51 mm
100 nm
HV=75kV
Direct Mag: 70500x

B

NIBRG-14_{mg}



Mg106-8.jpg
E0 30s
Print Mag: 35400x @ 51 mm
100 nm
HV=75kV
Direct Mag: 70000x

Figura 3

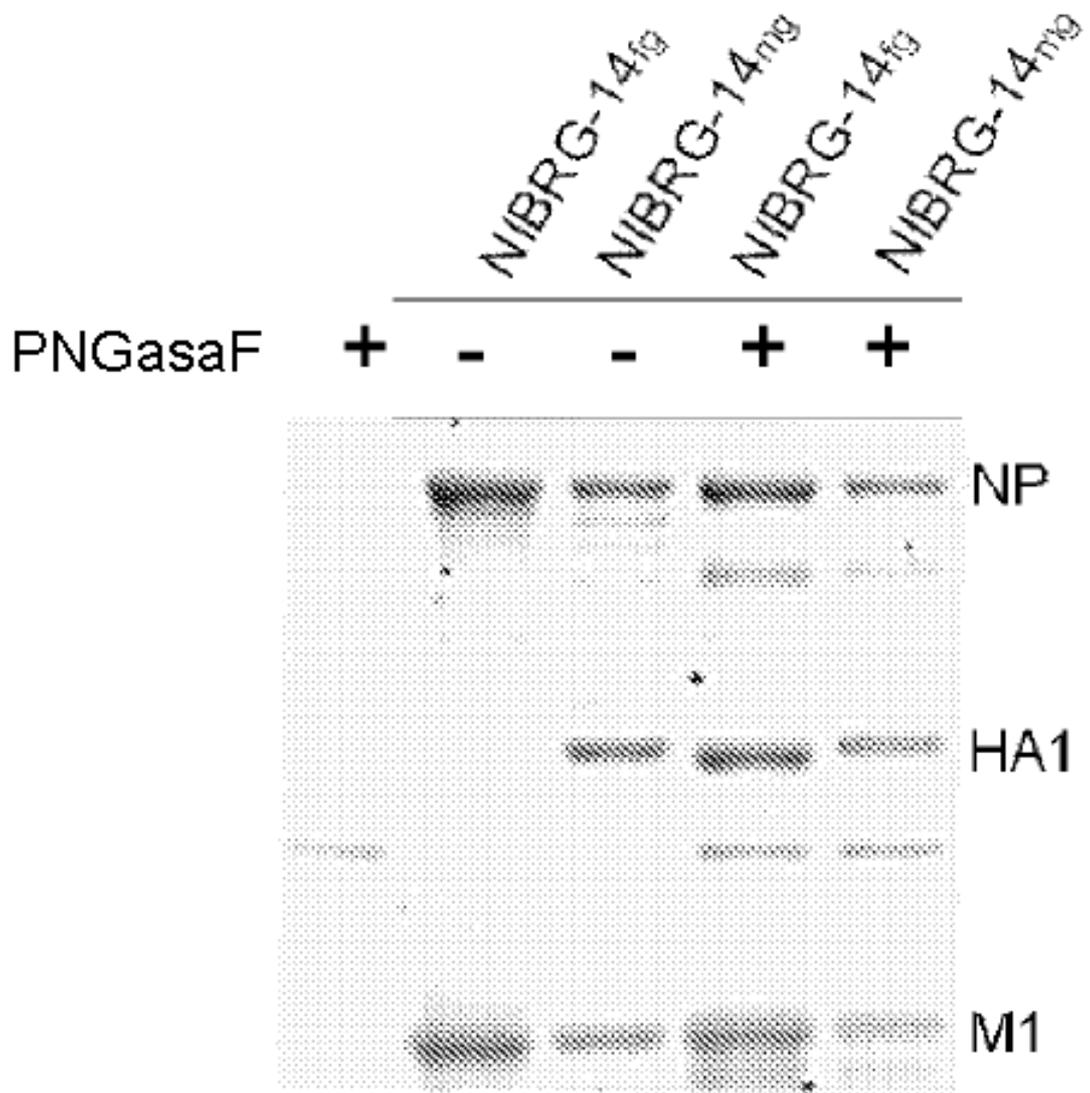
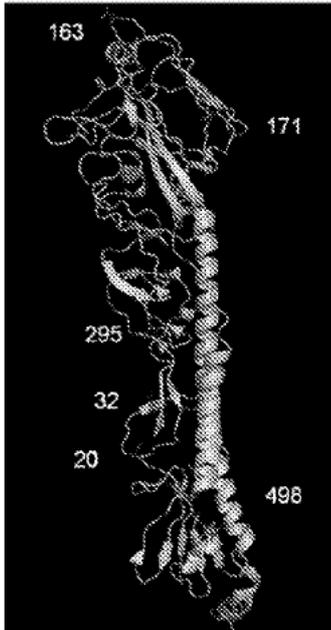


Figura 4

A



B

