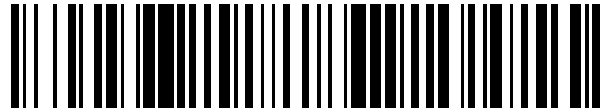


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 403 098**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.10.2007 E 07821171 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2013 EP 2087104**

54 Título: **Suplemento de medios para la producción de virus**

30 Prioridad:

12.10.2006 EP 06450142

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

14.05.2013

73 Titular/es:

**BAXTER HEALTHCARE SA (100.0%)
Thurgauerstrasse 130
8152 Glattpark (Opfikon), CH**

72 Inventor/es:

**ROETHL, ELISABETH y
EGOROV, ANDREJ**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 403 098 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

Suplemento de medios para la producción de virus

La presente invención propone el uso de anfotericina B como suplemento del cultivo para la propagación de los virus de la gripe A o B.

5 Además, se describen una composición farmacéutica que comprende un virus y anfotericina B, y su uso en la terapia del cáncer y en el tratamiento de la gripe.

10 En la actualidad, se producen numerosas vacunas víricas diferentes de las de la gripe usando células primarias tripsinizadas, por ejemplo células renales de mono, así como de riñón de conejo y hámster (véase, por ejemplo, el documento WO9738094). Los cultivos de células primarias diploides tienen determinadas ventajas tales como una preparación sencilla usando medios simples y sueros bovinos, con sensibilidad frente a una extensa gama de virus múltiples. Sin embargo, las células primarias diploides presentan inconvenientes tales como la contaminación por diversos agentes adventicios y calidad y sensibilidad variables; así como la dificultad para obtener tejidos apropiados para el cultivo (por ejemplo, riñones de mono).

15 Por el contrario, las ventajas de utilizar líneas celulares continuas son su conservación de las características antigénicas originales del virus infeccioso, estandarización, alta susceptibilidad a variantes del mismo virus, y la capacidad para cultivarlos como una masa de células de gran tamaño usando sistemas de fermentación de microportadores o en suspensión.

20 No obstante, estas ventajas en sí mismas determinan que estas líneas celulares sean adecuadas para ser usadas en la producción de vacunas. Mizrahi, ed., *Viral Vaccines*, Wiley-Liss, Nueva York (1990), páginas 39-67. Por ejemplo, el virus de la gripe A cultivado y sometido a pasajes exclusivamente en cultivos de células de mamíferos ha demostrado en ciertos casos que conserva la mayor parte o la totalidad de sus características antigénicas originales, una cualidad que podría resultar altamente beneficiosa en la producción de vacunas. (Romanova J. et al., *Virology*, 2003, 307(1):90-7; Romanova J. et al., *Virus Res.* 2004, 103:187-93).

25 Sin embargo, las células primarias diploides de mamífero presentan dificultades como sistemas hospedadores para la producción de vacunas. Esto se debe a problemas tales como la contaminación del cultivo celular por agentes adventicios, una calidad variable de las células en el cultivo celular, diferentes sensibilidades de las células a diferentes variantes del mismo virus, títulos virales bajos, y los elevados costos y las dificultades que entrañan la obtención y preparación de tales cultivos celulares.

30 Adicionalmente, entre las líneas celulares continuas estudiadas, solamente las células MDCK han demostrado ser útiles para conseguir potencialmente un crecimiento y aislamiento suficientes de virus (Frank et al., *J. Clin. Microb.* 10:3236 (1979); Schepetink y Kok, *J. Virol. Methods* 42:241-250 (1993)).

35 Otras dos líneas celulares continuas – células del riñón del mono verde africano (Vero) y del riñón del hámster recién nacido (BK-21) – han sido caracterizadas, autorizadas y certificadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS/WHO) para la producción de vacunas humanas. Sin embargo, las células Vero, aunque están autorizadas, anteriormente se consideraron inapropiadas para la producción a gran escala de vacunas humanas contra el virus de la gripe. Por ejemplo, el crecimiento del virus de la gripe B en células Vero estuvo fuertemente limitado en comparación con las células MDCK (Nakamura et al., *J. Gen. Virol.* 56:199-202 (1981)). Adicionalmente, los intentos de utilizar células Vero para evaluar la sensibilidad a rimantadina de los virus de la gripe A humana H1N1 y H3N2 proporcionaron resultados ambiguos debido a los bajos títulos de virus producidos en estas células, en comparación con las células MDCK (Gorvakova EA et al., *J. Virol.*, 1996, 70:5519-24).

40 De este modo, estos y otros estudios indican que, con anterioridad, los virus de la gripe no habían replicado correctamente en células Vero, haciéndolas inadecuadas para la producción de vacunas a gran escala. (Demidova et al., *Vopr. Virosol* (en ruso) 346-352 (1979); Lau y Scholtissek, *Virology* 212:225-231 (1995)).

45 Kaverin NV y Webster RG (*J. Virol.*, 1995, 69(4):2700-3) describieron la necesidad de la adición repetida de tripsina al medio de cultivo de células Vero infectadas con virus de la gripe para restablecer el patrón de crecimiento multicíclico de las cepas del virus de la gripe A. Ahora bien, la adición repetida de tripsina es una tarea bastante laboriosa y requiere mucho tiempo, puesto que la adición debe realizarse en diversas etapas del cultivo (véase también Gorvakova EA et al., *J. Infect. Dis.*, 1995, 172:250-3).

50 Los miembros de la familia de los virus ADN contienen genomas de doble cadena. La familia de los parvoviridae es la única excepción. La mayor parte de los genomas ADN no son simples moléculas lineales. Por ejemplo, los genomas de papovirus son círculos de doble cadena, cerrados covalentemente, y los genomas de hepadnavirus son círculos dobles en los que una cadena contiene una mella ("nick") y la otra contiene un espacio ("gap"). Los extremos del genoma de doble cadena de poxvirus están unidos covalentemente, en tanto que los genomas de herpesvirus contienen duplicaciones terminales e internas.

Los virus ADN se clasifican en las familias siguientes: *Parvoviridae*, *Papovaviridae*, *Adenoviridae*, *Hepadnaviridae*, *Herpesviridae*, *Iridoviridae*, *Baculoviridae* y *Poxviridae*.

Los virus ARN de doble cadena se clasifican en los dos grupos de *Reoviridae* y *Birnaviridae*.

5 Las familias de virus que contienen ARN monocatenario envuelto del genoma de sentido negativo se clasifican en grupos que tienen genomas no segmentados (*Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Filoviridae* y Virus de la Enfermedad de Borna, *Togaviridae*), o aquellos que tienen genomas segmentados (*Orthomyxoviridae*, *Bunyaviridae* y *Arenaviridae*). La familia *Orthomyxoviridae* incluye los virus de la gripe, virus de tipos A, B y C, así como los virus *Thogoto* y *Dhori*, y el virus de la anemia infecciosa del salmón.

10 Los viriones de la gripe consisten en un núcleo interno de ribonucleoproteína (una nucleocápside helicoidal) que contiene el genoma de ARN monocatenario, y una envuelta de lipoproteína exterior revestida en su cara interna por una proteína de matriz (M1). El genoma segmentado del virus de la gripe A consiste en ocho moléculas (siete en el caso de la gripe C) de ARN monocatenario, lineal y de polaridad negativa que codifican diez polipéptidos, incluidos: las proteínas de polimerasa ARN, ARN-dependientes (PB2, PB1 y PA), y la nucleoproteína (NP), que forma de nucleocápside; las proteínas de la membrana de matriz (M1, M2); dos glicoproteínas de superficie que se proyectan desde la envuelta que contiene lípidos: hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA); la proteína no estructural (NS1) y la proteína de exportación nuclear (NEP).

20 La transcripción y replicación del genoma tienen lugar en el núcleo y el ensamblaje se realiza a través de germinación en la membrana plasmática. Los virus pueden recombinar genes durante infecciones mixtas. El virus de la gripe se adsorbe a través de la HA a los sialiloligosacáridos en las glicoproteínas y glicolípidos de la membrana celular. Tras la endocitosis del virión, se produce una variación conformacional de la molécula de HA en el interior del endosoma celular que facilita la fusión de la membrana, desencadenando de esta forma la pérdida de la envuelta. La nucleocápside migra hacia el núcleo, en donde se transcribe el ARNm viral. El ARNm viral se transcribe por medio de un mecanismo único en el que la endonucleasa viral escinde el extremo 5' terminal provisto de caperuza desde los ARNm heterólogos celulares que, a continuación, actúan como cebadores para la transcripción de las cadenas de molde de ARN viral mediante la transcriptasa viral. Los transcritos finalizan en los sitios 15 a 22 bases de los extremos de sus moldes, en donde secuencias oligo(U) actúan como señales para la adición de colas poli(A). De las ocho moléculas de ARN viral producidas de esta forma, seis son mensajes monocistronicos que se traducen directamente en las proteínas que representan HA, NA, NP, y las proteínas de polimerasa viral, PB2, PB1 y PA. Los otros dos transcritos experimentan empalme, proporcionando dos ARNm que se traducen en diferentes marcos de lectura para producir M1, M2, NS1 y NEP. Dicho en otras palabras, los ocho segmentos de ARN viral codifican once proteínas: nueve proteínas estructurales y no estructurales y la proteína identificada recientemente PB1-F2.

30 A la vista de las dificultades para la producción de grandes cantidades de partículas virales necesarias para aplicaciones específicas de profilaxis y terapéuticas, un objeto de la invención es ofrecer nuevos métodos de cultivo y suplementos capaces de aumentar el rendimiento y la calidad de virus propagados en líneas celulares continuas.

35 El problema se resuelve por medio del uso de anfotericina B como suplemento de cultivo para la propagación de virus.

Según la técnica anterior, se sabe que los antibióticos macrólidos poliénicos exhiben propiedades antifúngicas, y se utilizan ampliamente para el tratamiento y la prevención de infecciones fúngicas en animales y pacientes humanos.

40 Aparte de las propiedades ya conocidas de los antibióticos macrólidos poliénicos, los inventores de la presente invención han demostrado sorprendentemente que la anfotericina B se puede utilizar también para el cultivo y propagación de partículas virales que, con frecuencia, resultan difíciles de cultivar y que, a menudo, se requieren en grandes cantidades para diversos propósitos tales como aplicaciones profilácticas, terapéuticas e industriales. Se ha descrito que el éster metílico de anfotericina B, un derivado de la anfotericina B, incrementa la infectividad del virus ARN de la encefalomiocarditis y del virus ADN SV40 (Borden E. et al., *J. Gen Virol.*, 1979, 42, 297-303; Borden E. et al., *Archives of Virology*, 1981, 69, 161-165), si bien no existe información en la técnica anterior que demostrara o indicara su uso con fines de cultivos virales.

45 Con el uso de anfotericina B de acuerdo con la especificación es posible aumentar el crecimiento de virus, lo que también podría dar lugar a un incremento de la infectividad de las partículas virales incluso con una baja multiplicidad de infección.

50 Según la invención, los virus que se pueden cultivar de manera eficaz son el virus de la gripe A o el virus de la gripe B.

En una realización alternativa, los virus cultivados pueden contener modificaciones en numerosos genes estructurales y no estructurales, preferiblemente modificaciones de los genes NS1 y/o PB1. Dichas modificaciones pueden ser deleciones, sustituciones o inserciones de al menos un ácido nucleico.

De manera alternativa, los virus cultivados en medios que contienen anfotericina B pueden ser también virus oncolíticos.

Los derivados, análogos o fragmentos de virus pueden ser, por ejemplo, cualquier partícula de un virus de la gripe A o B que aún se pueda usar con fines de vacunación o que muestre propiedades oncolíticas.

- 5 Los virus se cultivan habitualmente usando células infectadas por virus que han demostrado ser aplicables con el fin de propagar partículas virales.

La invención ofrece, asimismo, un método para la infección de células para el cultivo de virus empleando anfotericina B, que comprende las etapas siguientes:

- a) infección de las células con al menos una partícula infecciosa del virus de la gripe A o B
- 10 b) adición de anfotericina B al inóculo y/o medio de cultivo, junto con tripsina
- c) incubación bajo condiciones apropiadas, seguida de
- d) recolección de la cosecha viral y, opcionalmente
- e) purificación y caracterización de los virus.

- 15 De forma sorprendente, se ha demostrado que con el uso del suplemento o una mezcla de suplementos según la invención puede obtenerse un incremento del crecimiento viral de al menos 0,1 log₁₀, preferiblemente de al menos 0,5 log₁₀, preferiblemente 1 log₁₀, más preferiblemente al menos 2 log₁₀, todavía más preferiblemente de al menos 2,5 log₁₀ y, de manera todavía más preferida, de al menos 5 log₁₀.

La presente invención ofrece, igualmente, una formulación farmacéutica que comprende un virus de la gripe A o B y anfotericina B. Preferiblemente, el virus es un virus de la gripe A o B vivo atenuado.

- 20 Según una realización alternativa, la formulación farmacéutica puede contener un virus de la gripe A o B, junto con anfotericina B. Dependiendo del tipo de virus que contenga, la preparación farmacéutica se puede utilizar para el tratamiento o la profilaxis del cáncer o de la infección de gripe.

- Adicionalmente, la presente invención se puede usar para el aislamiento o titulación de partículas virales. Este aspecto es especialmente importante, puesto que la infección de células para el cultivo de virus requiere a menudo grandes cantidades de virus debido a la ausencia de índices de infección suficientes y mecanismos de replicación ineficientes. La cantidad de virus se puede reducir en gran medida agregando al menos anfotericina B poco antes, al mismo tiempo o poco después del proceso de infección.
- 25

Figuras

Figura 1 muestra el efecto de anfotericina B sobre el crecimiento del virus de la gripe.

- 30 La monocapa subconfluente de células Vero tuvo valores diferentes de multiplicidad de infección (m.d.i.) (0,001, 0,0001 y 0,00001). El medio de crecimiento viral contuvo 5 µg/ml de tripsina y 0 o 250 ng/ml de anfotericina B. Para cada valor de m.d.i., se recolectaron virus (con y sin anfotericina B) en el momento en que el efecto citopático del virus de crecimiento más rápido alcanzó niveles entre 50 y 95%. Para todos los virus incubados en presencia de anfotericina B, el efecto citopático y, por lo tanto, el título viral se desarrollaron más rápidamente que en los cultivados sin anfotericina B. Se compararon los títulos de TCID₅₀.
- 35

Fig. 1a muestra el efecto sobre la cepa H1N1.

Fig. 1b muestra el efecto sobre la cepa H3N2.

Fig. 1c muestra el efecto sobre la cepa de gripe B.

Figura 2 muestra los resultados de titulación en presencia y en ausencia de anfotericina B.

- 40 a) El virus de la gripe B/Vienna/32/2006 (similar a la cepa A/Malaysia/2506/2004) se tituló por ensayo de placa en presencia (columna izquierda) y ausencia (columna derecha) de anfotericina B. El virus cultivado en presencia de anfotericina B dio como resultado un incremento de aprox. 2,5 log de la producción viral.
- b) Virus Δ NS1 similar a la cepa (A/New Caledonia/20/99(H1N1) diluido en serie y titulado de manera paralela en presencia y ausencia de 250 ng/ml de anfotericina B por ensayo de TCID₅₀. Después de 3 días de incubación a 37°C, se evalúa el efecto citopático en los pocillos y se calculan los títulos.
- 45

Figura 3 muestra estudios de escalada de dosis usando anfotericina B.

- 5 Una monocapa subconfluente de células Vero se infectó con el virus A/Vienna/28/2006 (similar a la cepa A/Wisconsin/67/2005)(H3N2) con una multiplicidad de infección de 0,001. Después de la infección, se agregaron diferentes concentraciones de anfotericina B (0, 31,25, 62,5, 125, 250, 500 y 1.000 mg/ml, respectivamente) al medio de cultivo. Los virus se recolectaron después de 48 horas y se sometieron a titulación por ensayo de TCID50 en presencia de anfotericina B. El uso de concentraciones en el intervalo de 250 a 500 ng/ml dio como resultado títulos virales máximos.
- 10 Los antibióticos macrólidos poliénicos y sus derivados y análogos se pueden dividir generalmente en trienos, tetraenos, pentaenos, hexaenos y heptaenos, de acuerdo con el número de dobles enlaces conjugados que poseen y con la posesión o carencia de un carbohidrato unido por un enlace glicosídico. Consúltese Hamilton-Miller J.M.T., *Bacteriol. Reviews*, 1973, 37, 166-196. Según una realización preferida de la invención, los antibióticos macrólidos poliénicos son heptaenos como, por ejemplo, anfotericina B, candidina, micoheptina, X-63, candimicina, DJ400 B1, perimicina, antifungina 4915, eurotina A, heptaeno 757, monicamicina, neoheptaeno, Nistatina, Filipina, Primaricina, Natamicina y PA150, y sus derivados y análogos.
- 15 Según la realización, el antibiótico macrólido poliénico es anfotericina B. La anfotericina B se puede producir por el cultivo de un microorganismo tal como *Streptomyces nodosus* y extrayéndola del cultivo. La anfotericina B, esencialmente, es una lactona macrocíclica de alto peso molecular, que posee un cromóforo de 7 dobles enlaces conjugados. Además del gran núcleo de lactona, la anfotericina B presenta otros grupos característicos que incluyen un aminoazúcar. Sus derivados o análogos pueden ser de cualquier tipo y, aún así, ofrecen las características necesarias para su uso como suplemento para el cultivo de virus. Por ejemplo, podría ser N-acetilación, N-succinilación, esterificación o formación de complejos con CaCl₂. Por ejemplo, puede ser un éster metílico de anfotericina B o una formulación liposómica que contiene anfotericina B.
- 20 Según un planteamiento alternativo, es posible también usar mezclas de anfotericina B con sus derivados o diversas mezclas de derivados de anfotericina B como suplemento para el cultivo de virus y los métodos según la invención.
- 25 Según la invención, la anfotericina B se usa en una concentración suficiente para estimular el cultivo de virus. Preferiblemente, la concentración es de entre 0,5 ng/ml y 5 microgramos (mcg)/ml, preferiblemente de entre 0,5 ng/ml y 2,5 mcg/ml, preferiblemente de entre 10 ng/ml y 900 ng/ml, de forma más preferida de entre 100 ng/ml y 500 ng/ml y, más preferiblemente, de entre 200 ng/ml y 400 ng/ml.
- Según la presente invención, la anfotericina B se puede utilizar para el cultivo de cualquier virus de la gripe A o B.
- 30 El genoma de *Orthomyxoviridae* consiste en seis a ocho moléculas de ARN monocatenario de polaridad negativa (complementaria con el ARNm). Los viriones de la gripe están formados por un núcleo de ribonucleoproteína interna (una nucleocápside helicoidal) que contiene el genoma de ARN monocatenario, y una envuelta de lipoproteína externa, revestida en su cara interior por una proteína de matriz (M1). El genoma segmentado del virus de la gripe A consiste en ocho moléculas (siete para la gripe C) de ARN monocatenario lineal, de polaridad negativa, que codifican diez polipéptidos, que incluyen: las proteínas de ARN polimerasa, dependientes del ARN (PB2, PB1 y PA) y la nucleoproteína (NP), que forman la nucleocápside; las proteínas de membrana de matriz (M1, M2); dos glicoproteínas de superficie que se proyectan desde la envuelta, y que contienen lípidos: hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA); la proteína no estructural (NS1) y la proteína de exportación nuclear (NEP).
- 35 Los virus usados en la invención se pueden seleccionar a partir de cepas, variantes o mutantes de origen natural; virus mutagenizados (por ejemplo, generados por exposición a mutágenos, pasajes repetidos y/o pasaje en hospedadores no permisivos); reordenantes (en el caso de genomas virales segmentados); y/o virus manipulados por ingeniería genética (usando, por ejemplo, técnicas de "genética inversa").
- 40 Preferiblemente, el virus cultivado mediante la adición de anfotericina B se selecciona del grupo de virus de la gripe A o de la gripe B.
- 45 Según la presente invención, los virus pueden contener modificaciones en su genoma que den lugar a la expresión y producción de derivados o análogos de los propios virus. En una realización alternativa, la modificación puede estar presente dentro del gen NS1 y/o del gen PB1. Esto puede llevar a la producción de un virus que contenga una proteína NS1 completamente delecionada o modificada de otra forma, y/o una proteína PB1-F2 completamente delecionada o modificada, o una proteína PB2 modificada, expresada a partir del fragmento genómico de PB1. Las modificaciones en el interior del gen NS1 pueden ser deleciones, inserciones o sustituciones. Ejemplos de estos virus ARN modificados se describen en los documentos WO99/64068 y WO99/64571, que se incorporan como referencia a la presente memoria, en los que las modificaciones dentro del gen NS1 dan lugar a virus que tienen un fenotipo antagonista de interferón que es responsable de la atenuación.
- 50 La función de PB1-F2 se ha descrito de forma detallada en Chen W. et al., *Nat. Med.* 2001, 12:1306-12. Las modificaciones en la proteína PB1-F2 que se ha demostrado que contribuyen a la patogénesis viral en el ratón se han descrito en Zamarin D. et al., *J. Virol.*, 2006, 80, 7976-7983.
- 55

De manera alternativa, el virus puede ser también un virus oncolítico. La característica fundamental típica de los virus oncolíticos es su fenotipo de replicación condicional que les permite crecer en células malignas, pero no en el tejido normal. En una realización preferida de la invención, puede tratarse de un virus oncolítico de la gripe A que exhibe una modificación en el gen NS1 que no crece en sistemas IFN-competentes, pero que se replica eficazmente en sistemas que carecen de expresión de IFN funcional.

Las células utilizadas para el cultivo de virus, empleando un medio de cultivo suplementado con anfotericina B, pueden ser cualquier célula capaz de crecer *in vitro* en medios sintéticos y que se pueden usar para la propagación de virus. Dentro del alcance de la invención, el término "células" significa el cultivo de células individuales, tejidos, órganos, células de insecto, células de aves, células de mamíferos, células de hibridoma, células primarias, líneas celulares continuas, y/o células modificadas por ingeniería genética tales como células recombinantes que expresan un virus. Estas pueden ser, por ejemplo, células BSC-1, células LLC-MK, células CV-1, células CHO, células COS, células de ratón, células humanas, células HeLa, células 293, células VERO, células MDBK, células MDCK, células CRFK, células RAF, células TCMK, células LLC-PK, células PK 15, células WI-38, células MRC-5, células T-FLY, células BHK, células SP2/0, NS0, PerC6 (células de la retina humana), células de embrión de pollo o derivados, células de huevos embrionados, huevos de pollo embrionados o derivados de los mismos. Preferiblemente, la línea celular es una línea celular VERO.

El medio de cultivo usado para la producción de virus puede ser cualquier medio conocido de la técnica anterior que sea aplicable al cultivo de virus. Preferiblemente, el medio de cultivo es un medio sintético. Puede ser, por ejemplo, un medio basal tal como medio de Eagle Modificado MEM, medio esencial mínimo MEM, medio de Eagle modificado por Dulbecco D-MEM, medio D-MEM-F12, medio E de Williams, medio RPMI y análogos y derivados de los mismos. Asimismo, estos pueden ser medios para el cultivo de células de especialidad y para el crecimiento de virus tales como VP-SFM, OptiPro®, SFM, medio AIM V®, HyQ SFM4MegaVir®, EX-CELL®, Vero SFM, EPISERF, ProVero, cualquier medio 293 o CHO, y sus análogos y derivados. Estos medios pueden estar suplementados con cualquier aditivo conocido por la técnica anterior que sea aplicable al cultivo de células y virus tales como, por ejemplo, sueros animales y fracciones o análogos de los mismos, aminoácidos, factores de crecimiento, hormonas, soluciones tampón, elementos traza, tripsina, piruvato sódico, vitaminas, L-glutamina y tampones biológicos. El medio preferido es OptiPRO® SFM suplementado con L-glutamina y tripsina.

De manera particular, también se puede usar anfotericina B para aumentar la eficacia de la velocidad de infección. Para incrementar la infección de las células, éstas se hacen contactar simultáneamente con partículas virales y anfotericina B. De forma alternativa, las células pueden ser tratadas previamente con anfotericina B poco antes, al mismo tiempo o poco después de agregar las partículas virales a las células. El intervalo de tiempo preferido sería, por lo tanto, entre 1 hora antes o después de la infección, más preferiblemente entre 0,5 horas antes o después de la infección.

Por la técnica anterior, es bien sabido que una alta multiplicidad de infección (m.d.i.) tiene como consecuencia la producción de un número elevado de partículas virales defectuosas que muestran infectividad disminuida o nula. Por lo tanto, por motivos económicos y científicos, puede ser conveniente proporcionar medios en los que se puedan utilizar para la infección de las células una m.d.i. baja (m.d.i. de 0,001) o, incluso mejor, muy baja (m.d.i. de 0,0001 hasta 0,00001) o, incluso, m.d.i. más reducidas.

Con el empleo del suplemento o de una mezcla de suplementos según la invención puede producirse un incremento del crecimiento de virus de al menos 0,1 log₁₀, al menos 0,5 log₁₀, preferiblemente al menos 1 log₁₀, más preferiblemente de al menos 2 log₁₀, aún más preferiblemente de al menos 2,5 log₁₀ y, de manera todavía más preferida, de al menos 5 log₁₀.

Una realización adicional de la invención se refiere al uso de anfotericina B para la transfección de células Vero con plásmidos de expresión que codifican segmentos de ARN viral. Una vez más, se agrega anfotericina B al medio de cultivo poco antes, al mismo tiempo o poco después de haber transfectado las células con plásmidos de expresión que contienen la totalidad o parte del genoma viral completo.

Una realización adicional de la invención hace referencia a una formulación farmacéutica que comprende virus vivos atenuados y anfotericina B, opcionalmente junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. El virus es un virus de la gripe o un virus oncolítico.

En el caso en que la preparación farmacéutica comprende un virus oncolítico, se la puede utilizar en terapia viral del cáncer. En caso de que la preparación farmacéutica comprenda un virus de la gripe, puede ser usada en el tratamiento de una infección por un virus de la gripe.

Preferiblemente, la preparación farmacéutica comprende un virus vivo atenuado.

La preparación se puede administrar en una cantidad adecuada. Una cantidad adecuada podría estar comprendida en el intervalo de 2 a 10 logs, preferiblemente 5 a 9 logs, más preferiblemente de 6,5 a 8 logs de partículas virales.

La preparación usada según la invención se suministra preferiblemente en una formulación apropiada. Se prefieren las formulaciones que comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Esta última comprende, por ejemplo, agentes auxiliares, soluciones tampón, sales y conservantes. Preferiblemente, se ofrece una solución para infusión lista para su uso. Dado que las preparaciones de virus son relativamente estables, los medicamentos basados en virus o sus derivados tienen la ventaja sustancial de que pueden ser comercializados como una solución estable al almacenamiento, o como una formulación lista para su uso. La primera es, preferiblemente, estable al almacenamiento en la formulación a temperatura refrigerada hasta temperatura ambiente. Sin embargo, la preparación usada según la invención se puede suministrar también en forma congelada o liofilizada, susceptible de ser descongelada o reconstituida en el momento necesario. Habitualmente, la preparación se administrará por vía intranasal o intramuscular. No obstante, se puede seleccionar también otro modo de administración parenteral o a través de una mucosa, lo que conduce la sustancia activa a una aplicación sistémica o local en el punto de infección o el tumor.

La presente invención ofrece igualmente medios para acelerar e incrementar la calidad y la sensibilidad del ensayo de TCID₅₀ convencional, el ensayo basado en TCID₅₀ o de los ensayos de placa. Según el uso de anfotericina B para el cultivo de virus de la gripe A o B, el crecimiento del virus se acelera y, por consiguiente, los ensayos se pueden analizar más rápidamente y es posible obtener un resultado de titulación más preciso en un periodo de tiempo menor.

Adicionalmente, la presente invención proporciona un método de aislamiento de virus a partir de muestras clínicas en las que existen células, por ejemplo células Vero, infectadas con partículas virales procedentes de las vías respiratorias del paciente, en presencia de anfotericina B, y las células infectadas se incuban bajo condiciones apropiadas para estimular el crecimiento del virus en presencia de anfotericina B, así como su aislamiento y caracterización. Los programas de vigilancia del virus de la gripe requieren sistemas de aislamiento eficaces de dichos virus a partir de muestras clínicas. Habitualmente, este procedimiento incluye la infección de huevos de pollo embrionados o células MDCK con material recogido de lavados naso-faríngeos. La eficacia del procedimiento varía de un año para otro en función del tipo de virus y del sustrato celular. Se sabe que el aislamiento en huevos y, en algunas ocasiones, también en células MDCK, genera variantes virales mutantes diferentes de los virus reales que se hallan presentes en poblaciones humanas. Se ha demostrado que las células Vero podrían ser un sustrato mejor para el aislamiento y la caracterización del virus de la gripe, puesto que las propiedades de los virus derivados de células Vero reflejan con mayor exactitud la naturaleza de los virus humanos (Romanova J. et al., 2003). Desgraciadamente, sin embargo, la sensibilidad de la línea celular Vero para el aislamiento de virus es más baja que la de las células MDCK.

Según la invención, la anfotericina B mejora el aislamiento del virus de la gripe a partir de muestras clínicas en células Vero. Con el uso del método según la invención es posible ofrecer un aumento del porcentaje de casos de aislamiento positivos, dado que por lo general resulta muy difícil lograr un nuevo aislamiento del virus a partir de muestras clínicas en células Vero.

La descripción anterior se entenderá mejor haciendo referencia a los ejemplos siguientes.

Ejemplos

Ejemplo 1

El objetivo de este experimento es determinar el efecto de anfotericina B sobre diferentes virus de la gripe a multiplicidades de infección decrecientes. Los tres virus seleccionados reflejan los subtipos actualmente circulantes H1N1, H3N2 y B, tal como lo recomienda la OMS para la vacuna estacional 2006/07 en el hemisferio norte. (<http://www.who.int/csr/disease/influenza/vaccinerecommendations1/en/>).

Una monocapa subconfluente de células Vero, libre de suero, se infecta con multiplicidades de infección decrecientes de 0,001, 0,0001 o 0,00001. Se utilizan dos virus de la gripe A representativos, A/New Caledonia/20/99(H1N1) y A/Vienna/28/2006(H3N2) (similar a la cepa A/Wisconsin/67/2005), así como un candidato de la gripe B, B/Vienna/32/2006 (similar a la cepa B/Malaysia/2506/2004). El medio de crecimiento agregado después de la infección se suplementa con 5 µg/ml de tripsina, así como 0 o 250 ng/ml de anfotericina B, respectivamente. Se recoge el sobrenadante de todas las células infectadas con la misma multiplicidad de infección (0 y 250 ng/ml de anfotericina B) cuando se observa un efecto citopático de 50% o mayor en los virus de crecimiento más rápido. Los títulos virales se determinan por ensayo de TCID₅₀.

Como se ilustra en las Figuras 1a, 1b y 1c para los tres virus analizados, es posible deducir un efecto positivo de la anfotericina B sobre la replicación viral. Para el virus A/New Caledonia/20/99(H1N1) se puede observar un efecto de anfotericina B sobre el crecimiento viral. En presencia de anfotericina B, los títulos se encuentran dentro de un intervalo de 8E+05 a 2E+07 TCID₅₀/ml, con m.d.i. (multiplicidad de infección) decreciente; con la m.d.i. mínima, se obtiene 1 log menos de virus cuando no se agrega anfotericina B. En el caso del virus A/New Caledonia/20/99, la m.d.i. mínima de 0,00001 parece ser óptima en términos de crecimiento viral y efecto de anfotericina B.

El virus A/Vienna/28/2006(H3N2) confirma los resultados del virus H1N1, exhibiendo incluso una mayor sensibilidad al efecto de la sustancia. A las tres m.d.i. analizadas, se obtiene como mínimo un título viral 1 log mayor menos que si el cultivo se realiza en presencia de anfotericina B y se recoge en el mismo momento.

5 Un efecto aún más destacado de la sustancia se registra con el virus B/Vienna/32/2006 (similar a la cepa B/Malaysia/2506/2004). Los títulos medidos para virus cultivados en presencia de anfotericina B están dentro de un intervalo entre $1.E+07$ (m.d.i. 0,001) y $1E+06$ (m.d.i. 0,00001) TCID50/ml. Por el contrario, cuando no se agrega anfotericina, el virus apenas replica, dando lugar a títulos situados por debajo de $3E+05$ TCID50/ml; con la m.d.i. mínima no se obtienen virus en absoluto. En comparación con los virus A, el virus B exhibe la máxima sensibilidad a la sustancia. Este efecto se puede explicar en parte por el hecho de que se adaptó al crecimiento de células Vero libres de suero, en presencia de anfotericina B.

10 En general, se puede concluir que anfotericina B ejerce un efecto evidente sobre el crecimiento viral de los tres subtipos de virus estudiados anteriormente citados.

Material y métodos:

Células y virus:

15 Se cultivan células Vero en condiciones libres de suero; el medio usado es OptiPro® SFM suplementado con L-glutamina 4 mM. Las células se cultivan realizando pasajes cada 2 a 3 días en una proporción de 1:3 a 1:4. El medio de crecimiento utilizado es SFM suplementado con L-glutamina 4 mM.

20 El virus A/New Caledonia/20/99 deriva de NIBSC, número de producto 03/208 y se somete a 3 pasajes en células MDCK. La adaptación al crecimiento en células Vero libres de suero se lleva a cabo sometiendo los virus derivados de MDCK a 4 pasajes en células Vero, en ausencia de anfotericina B.

El virus A/Vienna/28/2006(H3N2) y un virus similar a la cepa A/Wisconsin/67/2005 (H2N3) se aislaron de una muestra clínica y se somete a 1 pasaje en células MDCK, seguido de 5 pasajes en células Vero libres de suero, en presencia y, a continuación, ausencia de anfotericina B.

25 El virus B/Vienna/32/2006, un virus similar a la cepa B/Malaysia/2506/2004, se aisló de una muestra clínica en células MDCK (2 pasajes) y, a continuación, se adaptó al crecimiento en células Vero libres de suero por medio de 6 pasajes en presencia de anfotericina B.

Ensayo de potencia

30 La titulación de virus se llevó a cabo por ensayo de TCID50 (dosis infecciosa de cultivo de tejidos), que es un ensayo de base celular que permite la determinación estadística de la potencia del virus en placas de 96 pocillos. El virus se diluye en serie, se infecta una monocapa subconfluente de células Vero (placa de 96 pocillos), el virus se hace crecer en presencia de $5 \mu\text{g/ml}$ de tripsina y 250 ng/ml de anfotericina B a 33°C (virus B) y 37°C (virus A). Después de 3 a 6 días de incubación, se comprueba el efecto citopático en los pocillos y se calcula el título en base a la fórmula de Reed L.J. et al., 1938, *Am. J. Hyg.* 27:493-497.

Ejemplo 2

35 Por medio de dos métodos diferentes, se titulan un virus B (similar a la cepa B/Malaysia/2506/2004) y un virus A/H1N1 (similar a la cepa A/New Caledonia/20/99 (H1N1)- Δ NS1) en presencia y ausencia de anfotericina B. En ambos casos, puede observarse un efecto evidente de la sustancia sobre el título final del virus, tal como se ilustra en las Fig. 2a y b.

40 En la Fig. 2a, se diluye en serie un virus B/Vienna/32/2006 (similar a la cepa B/Malaysia/2506/2004) y se titula en paralelo en presencia y ausencia de 250 ng/ml de anfotericina B por ensayo de placa. Después de 5 días de incubación a 33°C , se recuentan las placas y se compara directamente el número.

En la Fig. 2b se diluye en serie un virus Δ NS1 similar a la cepa (A/New Caledonia/20/99(H1N1)) y se titula en paralelo en presencia y ausencia de 250 ng/ml de anfotericina B por ensayo de TCID50. Después de 3 días de incubación a 37°C , se evalúa el efecto citopático en los pocillos y se calculan los títulos.

45 Como se puede ver en la Fig. 2a, se obtiene un título más de 2 log mayor cuando se cultiva el mismo virus en presencia de anfotericina B. En presencia de anfotericina B, se alcanza un título del virus B mayor que $1E+0,8$ ufp (unidad formadora de placa)/ml. Este resultado demuestra claramente que la sensibilidad del ensayo de placa aumenta significativamente con la adición de la sustancia.

50 En la Figura 2b, se tituló un virus A/H1N1 por TCID50, en presencia y en ausencia de anfotericina B. También en este caso se observa un aumento significativo del título, con un incremento de sensibilidad de prácticamente 1 log.

Material y métodos:

Células y virus:

5 Se cultivan células Vero bajo condiciones libres de suero; el medio usado es OptiPro® SFM suplementado con L-glutamina 4 mM. Las células se cultivan por medio de pasajes cada 2 a 3 días en una proporción de 1:3 a 1:4 a 37°C, con CO₂ al 5%.

El virus B/Vienna/32/2006 deriva del aislado clínico del virus similar B/Malaysia/2506/2004, aislado en células MDCK (2 pasajes), adaptado a continuación al crecimiento sobre células Vero libres de suero, con 6 pasajes en presencia de anfotericina B a 33°C.

10 El virus Δ NS1 similar a la cepa (A/New Caledonia/20/99(H1N1)) contiene proteínas de superficie HA y NA del virus A/New Caledonia/20/99(H1N1) y segmentos internos de la cepa A/Puerto Rico/8/34, en tanto que parte del segmento NS (No Estructural) ha sido eliminada. El virus se generó por técnicas de genética inversa y se sometió a pasaje en células Vero en ausencia de anfotericina B a 37°C.

Ensayo de potencia

Ensayo de placa

15 La titulación de los virus se lleva a cabo por ensayo de placa. El virus se diluye en serie, se infecta una monocapa confluyente de células Vero, la capa de recubrimiento consiste en medio de crecimiento de células Vero suplementado con 0,01% de DEAE Dextrano, hidrógeno-carbonato sódico saturado, 5 μ g/ml de tripsina y 0 o 250 ng de anfotericina B.

Ensayo de TCID50

20 El ensayo de TCID50 (dosis infecciosa en cultivo de tejidos) es un ensayo basado en células que permite la determinación estadística de la potencia del virus en placas de 96 pocillos. El virus se diluye en serie, se infecta una monocapa subconfluyente de células Vero (placa de 96 pocillos), el virus se hace crecer en presencia de 5 μ g/ml de tripsina y en presencia o ausencia de 250 ng/ml de anfotericina B a 37°C. Después de un periodo de incubación de 3 días, se comprueba el efecto citopático en los pocillos y se calcula el título en base a la fórmula de Reed L.J. et al., 1938, *Am. J. Hyg.* 27:493-497.

Ejemplo 3

En este experimento, se agregan diferentes dosis de anfotericina B tras la infección de células Vero con el virus similar a la cepa A/Wisconsin/67/2005(H3N2). Mediante el aumento de la concentración de anfotericina B es posible potenciar la replicación viral; las concentraciones entre 62,5 y 1.000 ng/ml muestran un efecto manifiesto.

30 Una monocapa subconfluyente de células Vero libres de suero se infecta con el virus A/Vienna/28/2006(H3N2), similar a la cepa A/Wisconsin/67/2005, a una multiplicidad de infección de 0,001. El virus se cultiva en presencia de concentraciones diferentes de anfotericina B, a saber 0, 31,25, 62,5, 125, 250, 500 y 1.000 ng/ml. La recolección del virus se lleva a cabo después de 48 horas y se titula por ensayo de TCID50 en presencia de 250 ng/ml de anfotericina B.

35 Se obtuvieron títulos dentro del intervalo de 8E+05 a 4E+07 TCID50/ml. Con las dos concentraciones más bajas (0 y 31,25 ng/ml), los títulos virales se encuentran por debajo de 1E+06 TCID50/ml, en tanto que los títulos virales aumentan por encima de 3E+07 TCID50/ml con 250 y 500 ng/ml de anfotericina B. Véase en la Figura 3 la ilustración de los resultados.

Material y métodos:

40 Células y virus:

Se cultivan células Vero bajo condiciones libres de suero; el medio usado es OptiPro® SFM suplementado con L-glutamina 4 mM. Las células se cultivan por medio de pasajes cada 2 a 3 días en una proporción de 1:3 a 1:4 a 37°C, con CO₂ al 5%.

45 El virus A/Wisconsin/28/2006(H3N2), aislado derivado de una muestra clínica del virus similar a A/Wisconsin/67/2005(H3N2), se somete a 1 pasaje sobre células MDCK, seguido de 5 pasajes sobre células Vero libres de suero, en presencia y, a continuación, en ausencia de anfotericina B.

Ensayo de potencia

5 La titulación de los virus se lleva a cabo por ensayo de TCID50 (dosis infecciosa en cultivo de tejidos), un ensayo basado en células que permite la determinación estadística de la potencia del virus en placas de 96 pocillos. El virus se diluye en serie, se infecta una monocapa subconfluente de células Vero (placa de 96 pocillos), el virus se hace crecer en presencia de 5 µg/ml de tripsina y 250 ng/ml de anfotericina B a 33°C (virus B) y a 37°C (virus A). Después de un periodo de incubación de 3 a 6 días, se comprueba el efecto citopático en los pocillos y se calcula el título en base a la fórmula de Reed L.J. et al., 1938, *Am. J. Hyg.* 27:493-497.

Ejemplo 4

Uso de anfotericina B para el rescate eficaz de virus tras la transfección viral

10 En este ejemplo, se transfectan células Vero libres de suero con 8 plásmidos que codifican los 8 segmentos del virus similar a la cepa A/Wisconsin/67/2005(H3N2), tal como lo describieron Hoffman et al., incluidas diversas modificaciones (Hoffman E. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2002, 99:11411-6). Seis horas después, se agrega medio de crecimiento que contiene 250 ng/ml de anfotericina B y 5 µg/ml de tripsina. El virus se recolecta parcialmente 6 días después de la transfección, una vez que se observa un evidente efecto citopático del virus transfectante cultivado en presencia de anfotericina B, registrándose igualmente signos de efecto citopático en ausencia de anfotericina B. La monitorización del virus sin anfotericina B se prolonga durante 3 días adicionales, durante los que se comprueba que no existe progresión de ningún signo de efecto citopático. El título se determina por ensayo de TCID50 en presencia de 250 ng/ml de anfotericina B.

Como se muestra en la Tabla 1, se obtiene un título de 2E+04 TCID50/ml en presencia de anfotericina B, en tanto que en su ausencia no se detectan virus.

20 Este ejemplo indica claramente que con la sola presencia de anfotericina B resulta posible rescatar eficazmente virus que, de lo contrario, no crecerían.

Material y métodos:

Células y virus:

25 Se cultivan células Vero bajo condiciones libres de suero; el medio usado es OptiPro® SFM suplementado con L-glutamina 4 mM. Las células se cultivan por medio de pasajes cada 2 a 3 días en una proporción de 1:3 a 1:4 a 37°C, con CO₂ al 5%.

30 El virus A/Vienna/28/2006(H3N2) es un virus similar a la cepa A/Wisconsin/67/2005 (H3N2) derivada de una muestra clínica, que se somete a pasaje 1 vez sobre células MDCK, seguido de 5 pasajes sobre células Vero libres de suero, en presencia y, a continuación, en ausencia de anfotericina B. Se clonan segmentos del virus en plásmidos que permiten simultáneamente la transcripción del ARN viral como molde para el genoma, así como ARNm para el procesamiento adicional hasta la proteína viral (Hoffman et al.; Eight-plasmid system for the rapid generation of influenza virus vaccines, *Vaccine*(20), 2002), en la cual los plásmidos se modificaron en consonancia. Los 8 plásmidos se transfectaron por electroporación en células Vero. Seis horas después de la transfección se agrega medio libre de suero que contiene 5 µg/ml de tripsina y 0 y 250 ng/ml de anfotericina B, respectivamente. El virus transfectante se recoge parcialmente después de 6 días y se continúa observando durante otros 3 días.

Ensayo de potencia

40 La titulación de los virus se lleva a cabo por ensayo de TCID50 (dosis infecciosa en cultivo de tejidos), un ensayo basado en células que permite la determinación estadística de la potencia del virus en placas de 96 pocillos. El virus se diluye en serie, se infecta una monocapa subconfluente de células Vero (placa de 96 pocillos), el virus se hace crecer en presencia de 5 µg/ml de tripsina y 250 ng/ml de anfotericina B a 33°C (virus B) y a 37°C (virus A). Después de un periodo de incubación de hasta 6 días, se comprueba el efecto citopático en los pocillos y se calcula el título en base a la fórmula de Reed L.J. et al., 1938, *Am. J. Hyg.* 27:493-497.

45 La Tabla 1 muestra el rescate del virus tras la transfección en presencia y ausencia de anfotericina B. Las células Vero se transfectan con 8 plásmidos que codifican los 8 segmentos del virus similar a la cepa A/Wisconsin/67/2005(H3N2). Seis horas después de la transfección, se agrega medio que contiene 5 µg/ml de tripsina y 0 o 250 ng/ml de anfotericina B. El virus se titula por ensayo de TCID50.

Adición de anfotericina B [+/-]	Título [TCID50]
+	2,0E+04

Adición de anfotericina B [+/-]	Título [TCID50]
-	<1,0E+01

Ejemplo 5

Aislamiento de virus a partir de muestras clínicas en células Vero, usando anfotericina B.

- 5 En 9 muestras clínicas tomadas de pacientes con infección confirmada del virus de la gripe B se evaluó la frecuencia del aislamiento del virus sobre células Vero, en presencia y en ausencia de anfotericina B. Cuando no se agregó anfotericina B, se lograron aislar con éxito virus de solamente 3 muestras. Al mismo tiempo, las 9 muestras dieron resultados positivos cuando se agregaron al medio de mantenimiento 500 ng/ml de anfotericina B.

REIVINDICACIONES

1. Uso de anfotericina B como suplemento del cultivo para la propagación del virus de la gripe A o B.
- 5 2. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la anfotericina B se encuentra en una concentración de entre 0,5 ng/ml y 5 microgramos/ml, preferiblemente entre 0,5 ng/ml y 2,5 microgramos/ml, preferiblemente entre 10 ng/ml y 900 ng/ml, más preferiblemente entre 100 ng/ml y 500 ng/ml y, de forma más preferida, entre 200 ng/ml y 400 ng/ml.
3. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el virus ARN contiene una modificación en los genes NS1 y/o PB1.
- 10 4. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la modificación es una delección, sustitución o inserción de al menos un ácido nucleico.
5. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el virus es un virus oncolítico.
- 15 6. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que las células se seleccionan del grupo que consiste en células BSC-1, células LLC-MK, células CV-1, células CHO, células COS, células de ratón, células humanas, células HeLa, células 293, células VERO, células MDBK, células MDCK, células MDOK, células CRFK, células RAF, células TCMK, células LLC-PK, células PK15, células WI-38, células MRC-5, células T-FLY, células BHK, células SP2/0, NSO, PerC6 (células de la retina humana), células de embrión de pollo o sus derivados, células de huevos embrionados, huevos de pollo embrionados o sus derivados.
- 20 7. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, con el que consigue un incremento del crecimiento viral de al menos 0,1 log10, preferiblemente de al menos 0,5 log10, más preferiblemente de al menos 1 log10, más preferiblemente de al menos 2 log10, todavía más preferiblemente de al menos 2,5 log10.
8. Uso de anfotericina B para la transfección de células Vero con plásmidos de expresión que contienen segmentos de ARN de los virus de la gripe A o B.
9. Método para la infección de células para el cultivo de virus de la gripe A o B, utilizando anfotericina B, que comprende las etapas siguientes:
 - 25 a) las células se infectan con al menos una partícula infecciosa del virus de la gripe A o B,
 - b) se agrega anfotericina B al inóculo y/o a los medios de cultivo, junto con tripsina,
 - c) incubación bajo condiciones apropiadas, seguida de
 - d) recolección de la producción viral y, opcionalmente,
 - e) purificación y/o caracterización de los virus.
- 30 10. Formulación farmacéutica que comprende virus vivos atenuados y anfotericina B, en donde el virus se selecciona del grupo que consiste en virus de la gripe A o B.
11. Uso de una preparación farmacéutica según la reivindicación 10 para la preparación de un medicamento para la terapia viral del cáncer o el tratamiento de la infección de gripe.
12. Método para el aislamiento de virus de la gripe a partir de muestras clínicas, en el que
 - 35 a) se infectan células con partículas virales de las vías respiratorias del paciente, en presencia de anfotericina B,
 - b) se incuban las células bajo condiciones apropiadas para estimular el crecimiento del virus en presencia de anfotericina B, y
 - c) aislamiento y caracterización del virus.

40

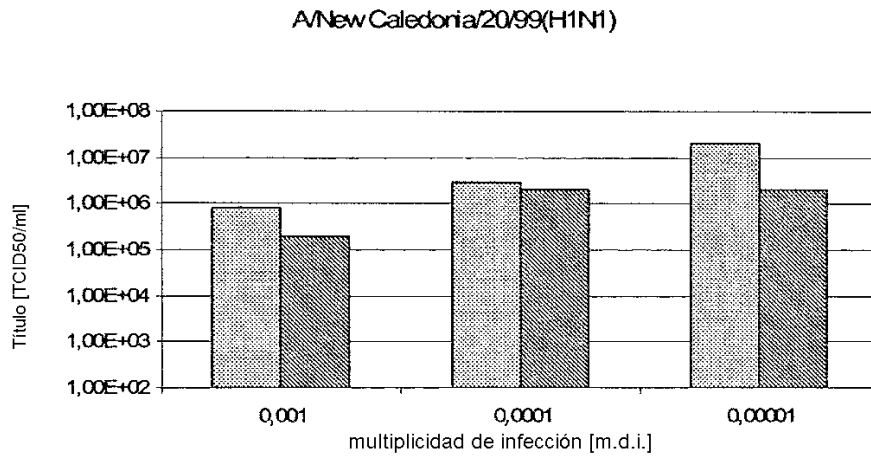


Fig. 1a

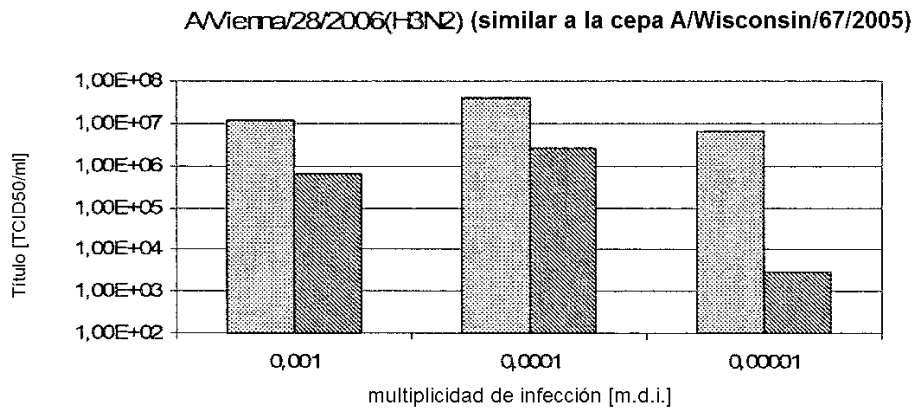


Fig. 1b

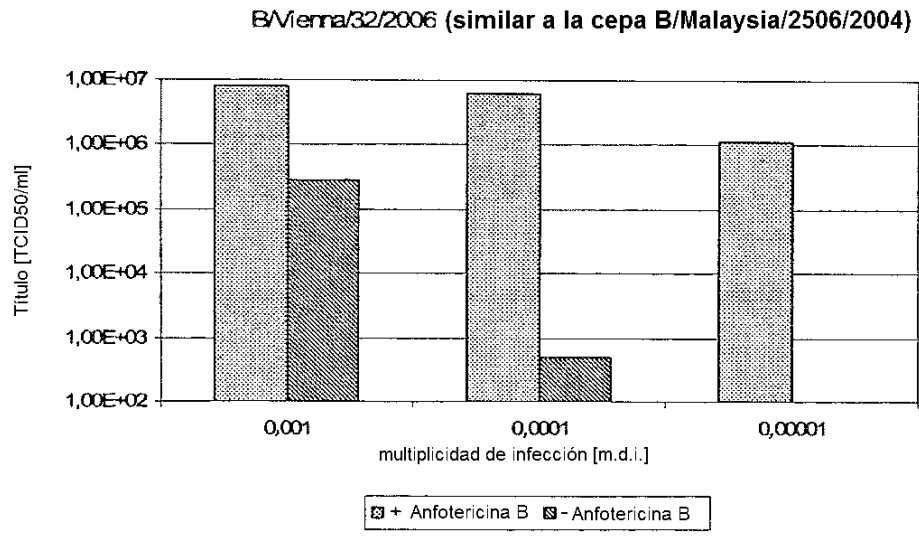


Fig. 1c

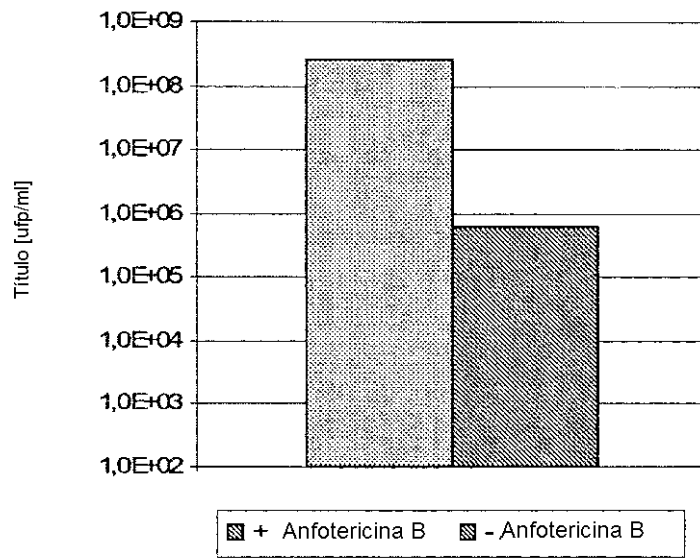


Fig. 2a

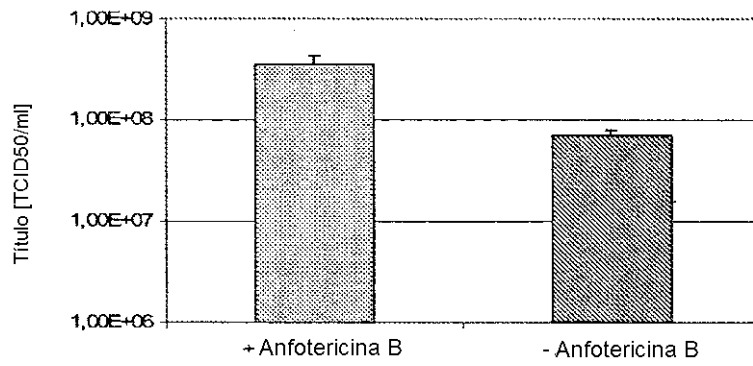


Fig. 2b

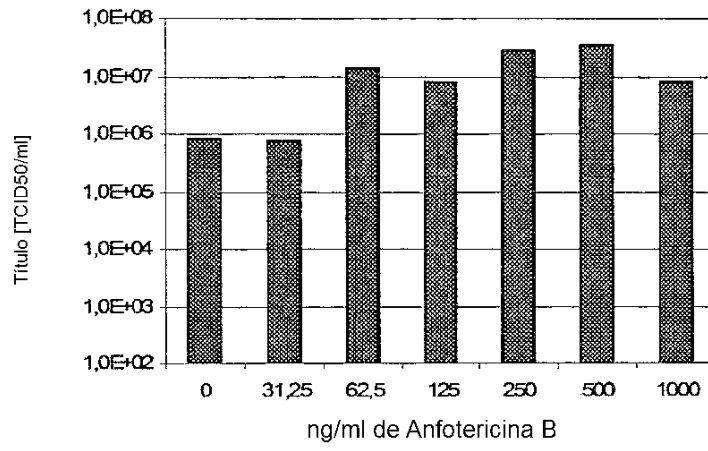


Fig. 3