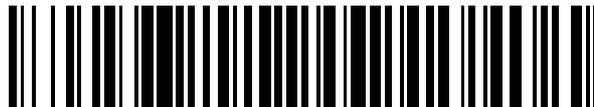


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 423 193**

51 Int. Cl.:

A61K 35/76 (2006.01)

C12N 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.12.2009 E 09774920 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2013 EP 2355834**

54 Título: **Protección antiviral con virus que contienen segmentos de genoma defectuoso**

30 Prioridad:

12.12.2008 GB 0822672

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

18.09.2013

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF WARWICK (100.0%)
University House Kirby Corner Road
Coventry CV4 8UW, GB**

72 Inventor/es:

**DIMMOCK, NIGEL y
EASTON, ANDREW**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 423 193 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

Protección antiviral con virus que contienen segmentos de genoma defectuoso

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a la virología y la prevención y/o tratamiento de infecciones y enfermedades virales en animales, incluyendo aves y seres humanos. La invención se refiere al campo de los tratamientos antivirales. La invención se refiere adicionalmente a métodos para estimular la inmunidad innata y la producción de interferón natural en seres humanos o animales y en partes componentes de seres humanos o animales, incluyendo células y tejidos. La invención se refiere específicamente al campo de los virus de interferencia defectuosos (DI), incluyendo virus DI clonados y composiciones que incluyen los mismos.

15 **Antecedentes de la invención**

Los *Orthomyxoviridae* son una familia de virus de ARN que infectan a vertebrados. La familia incluye los virus que causan la influenza.

La influenza es una infección viral del sistema respiratorio caracterizada por fiebre, tos y dolores musculares intensos. Hay tres géneros de virus de la influenza, que se identifican por las diferencias antigénicas en su nucleoproteína y su proteína de la matriz: *virus de la Influenza A*, *virus de la Influenza B* y *virus de la Influenza C*.

Los virus de la Influenza A y B contienen cada uno ocho segmentos de ARN de hebra sencilla (ARNhs). Los virus comprenden las principales proteínas externas del virión, hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). El género del *virus de la Influenza A* comprende 16 subtipos de HA y 9 subtipos de NA que probablemente forman las 144 permutaciones posibles. Sin embargo, la influenza B es un solo subtipo, y es significativamente distinta de la influenza A.

El virus de la influenza C contiene siete segmentos de ARNhs, debido a que el virus carece de un gen de la neuraminidasa separado (véase Lamb, R y Krug, R.M. (1996) Capítulo 45; *Orthomyxoviridae: The viruses and their replication* - Fields Virology, 3ª edición, Raven Publishers, Filadelfia).

Los miembros de la familia *Paramyxoviridae* son virus con una gama de anfitriones específicos de carácter limitado, pero en células cultivadas muestran una amplia gama de anfitriones. Las características de la infección *in vivo* incluyen la formación de cuerpos de inclusión y sincitios. La infección por paramixovirus comienza típicamente en el tracto respiratorio y puede permanecer en ese sitio (p. ej., virus sincitial respiratorio humano, HRSV) o puede extenderse a sitios secundarios (p. ej., tejidos linfoides y endoteliales para el virus del sarampión (MeV)). En general, las infecciones por paramixovirus están limitadas, y son eliminadas por la inmunidad del anfitrión. Sin embargo, a veces el virus se puede eliminar durante períodos de semanas o meses en condiciones normales y, sobre todo, en los individuos inmunocomprometidos.

Un género dentro de *Paramyxoviridae* es *Pneumovirus*. Este género incluye el virus sincitial respiratorio bovino (BRSV) y el virus sincitial respiratorio humano (HRSV) de los cuales hay dos subtipos denominados A y B y varias cepas de virus p. ej. cepa A2 de HRSV, cepa RS-S2 de HRSV y cepa Snook de BRSV. También hay un virus de la neumonía murina (también conocido como el virus de la neumonía de ratones: PVM).

Los medicamentos antivirales son una clase de medicación que se utiliza específicamente para el tratamiento de infecciones virales. Los antivirales específicos se utilizan con frecuencia en busca de virus específicos. La mayor parte de los antivirales disponibles en la actualidad están diseñados para ayudar a enfrentarse con el VIH, los virus del herpes (más conocidos por causar el herpes labial y el herpes genital, pero que en realidad causan una amplia gama de enfermedades), los virus de la hepatitis B y C (que pueden causar cáncer de hígado), y los virus de la influenza A y B. Los investigadores están trabajando en la actualidad para extender el rango de antivirales a otras familias de patógenos.

Por ejemplo, la amantadina y la rimantadina son eficaces contra todos los virus de la influenza tipo A, pero no contra los virus de la influenza tipo B. Los virus que son resistentes a estos compuestos son conocidos comúnmente. Otros anti-virus de la influenza A y B incluyen Zanamivir (Relenza®) y oseltamivir (Tamiflu®). Sin embargo, la eficacia de estas terapias es algo limitada. El tratamiento se tiene que iniciar pronto después de la infección y necesita ser administrado dos veces al día. El tratamiento antiviral solo es capaz de acortar la duración de los síntomas en uno a tres días. Se están encontrando cada vez más virus que son resistentes a Tamiflu en pacientes con influenza.

Se utilizan vacunas para generar una respuesta inmunológica para atacar a los virus. Las vacunas tradicionalmente consisten en una versión del patógeno debilitada o muerta. Más recientemente, se han ideado vacunas de "subunidades" que consisten estrictamente en las dianas proteicas del patógeno. Las vacunas estimulan el sistema

inmunitario sin causar daño grave al anfitrión, y por tanto el patógeno real ataca al sujeto, el sistema inmunitario responde a él rápidamente y lo bloquea.

5 Las vacunas pueden ser eficaces en la lucha contra la infección por virus estables, pero tienen uso limitado en el tratamiento de un paciente que, ya ha sido, o está persistentemente, infectado. Las vacunas contra los virus de mutación rápida, como la influenza, son problemáticas. La vacuna de la influenza tiene que ser actualizada cada año. Una vacuna contra el VIH, por ejemplo, sigue siendo difícil de alcanzar.

10 Los virus de interferencia defectuosos (DI) tienen una larga historia. Fueron descubiertos como elementos de auto-interferencia en preparaciones de virus de influenza A por von Magnus quien los estudió a finales de 1940 y principios de 1950 (p. ej., von Magnus, P (1947) Ark. Kemi. Mineral. Geol, 24b: 1). Durante muchos años estos elementos de interferencia fueron nombrados después de él. Más tarde, cuando se dieron cuenta de que estos elementos se encontraban casi universalmente entre los virus, se les denominó virus DI (véase, p. ej. Huang y Baltimore (1970) Nature 226: 325 -327). El interés por los virus DI alcanzó su punto máximo en la década de 1970, pero luego disminuyó debido a una expectativa exorbitante de su actividad antiviral *in vivo*.

20 Todos los virus de influenza A tiene un aparato de replicación que permite el intercambio de segmentos del genoma (recombinación) en las células infectadas dualmente, proporcionando a estos virus gran flexibilidad genética. Tal acontecimiento dio origen a los virus de la influenza pandémica de 1957 y 1968. Además del proceso de replicación normal, se producen errores en la replicación que dan lugar a pequeños ARN de 400-500 nucleótidos (nt) que carecen de alrededor de 80% de la secuencia central del molde, lo que parece ser el resultado de la función de copiado de la parte inicial del molde, separación del molde y a continuación reintegración y copiado del otro extremo por la polimerasa. Estos pequeños ARN conservan sus señales de replicación y encapsidación terminales. Su pequeño tamaño sugiere que se pueden elaborar más copias por unidad de tiempo en comparación con el segmento de ARN completo. La encapsidación de los ARN genómicos parece ser un proceso organizado de manera que un virión contiene solo una copia de cada uno de los 8 segmentos. Un virión parece no discriminar entre un ARN defectuoso y uno completo, de manera que cuando los ARN defectuosos se encuentran en exceso, estos se encapsidan con mayor frecuencia que el segmento de genoma intacto que sustituyen. Una partícula que contiene el segmento de genoma suprimido no puede sintetizar la proteína o las proteínas virales codificadas normalmente por ese ARN, y no es infecciosa, aunque pueda replicar en *trans* cuando esa célula sea infectada por un virus de la influenza A. La incorporación de los ARN defectuosos a los viriones da como resultado una reducción en la cantidad de virus infeccioso producido. De este modo los viriones que llevan un genoma suprimido fueron conocidos como virus de interferencia o de interferencia defectuosos (DI).

35 Los virus de la familia *Orthomyxoviridae* dan lugar espontáneamente a segmentos de ARN defectuoso como resultado de una delección interna (75-80% de los nucleótidos) en uno o más segmentos genómicos. Por consiguiente, el genoma del virus DI es una forma suprimida del genoma del virus infeccioso que dio lugar a la misma y tiene varias propiedades únicas que lo distinguen de otros tipos de moléculas defectuosas de ácidos nucleicos virales (véase Dimmock, N. J. (1996) "Antiviral activity of defective interfering influenza virus *in vivo*" - Viral and other infections of the human respiratory tract; S. Myint y D. Taylor-Robinson (eds.), Chapman & Hall).

45 En comparación con un virus activo, es decir, vivo o infeccioso, un virus DI, si bien es capaz de infectar una célula, se replica y se propaga solo cuando su genoma está presente en una célula que ha sido infectada por un virus con un genoma completo (denominado a veces como "virus coayudante"). El virus de la influenza DI está encapsidado en partículas de virus que son usualmente indistinguibles en tamaño y composición de proteínas de las partículas de virus coadyuvante infeccioso.

50 Una vez que ha surgido, *de novo*, un genoma DI se amplifica rápidamente en concentración con respecto a la del genoma del virus infeccioso, por lo que en unos pocos ciclos infecciosos (o pases) hay más virus DI en una población que virus coadyuvante infeccioso.

El virus DI tiene la capacidad de interferir intracelularmente en el virus coadyuvante infeccioso de modo que es capaz de inhibir específicamente la multiplicación del virus coadyuvante infeccioso.

55 Estudios en animales *in vivo* han demostrado que el virus de influenza A DI producido de forma espontánea (A/equine/Newmarket/7339/79 (H3N8)) puede, en cantidad suficiente, proteger a los ratones contra la sensibilización con influenza A letal tanto con el virus homólogo (EQV) como con los subtipos heterólogos A/WSN (H1N1) o A/PR/8/34 (H1N1). En estos estudios la preparación de virus DI fue tratada con UV con el fin de inactivar la infectividad de cualquier virus coayudante vivo presente. Esta cantidad de irradiación UV no inactiva la actividad de interferencia o protección del virus DI. Una única administración pareció proporcionar profilaxis durante un máximo de alrededor de 5 días. Sin embargo, estas preparaciones de virus influenza A DI fueron heterogéneas y comprendían una multiplicidad de secuencias de ARN defectuosas no definidas de diferentes segmentos genómicos (véase Noble y Dimmock (1994) Journal of General Virology 75: 3485 - 3491).

El virus de la influenza A DI A/WSN (H1N1) desarrollado en huevos de pollo embrionados protegió a los ratones frente a la sensibilización letal con A/WSN (H1N1). La comparación de las especies de virus con DI desarrolladas en huevo con virus con ARN DI extraídos de pulmones de ratones supervivientes demostró que se encontraban presentes al menos 5 supuestas secuencias de ARN DI. Cada una de las cinco especies de ARN del virus DI tenía una delección interna (véase Noble y Dimmock (1995) *Virology* 210: 9-19). Los extremos 3' y 5' de cuatro de estas moléculas de ARN aparecieron intactos.

Duhaut y Dimmock (2000, *Virology* 275: 278-285) modificaron un ARN de EQV con el segmento 1 defectuoso colocándolo bajo el control de un promotor de ARN polimerasa I humana (Pol I) en un plásmido. Cada uno de los plásmidos codifica ARN de aproximadamente 400 nucleótidos, pero, debido a la posición exacta de la delección interna, se mantuvieron diferentes longitudes de las secuencias de los extremos 5' y 3'. Se transfectaron células Vero con cada plásmido junto con plásmidos que codificaban las proteínas PB1, PB2, PA, y NP del virus de la influenza y a continuación las células se infectaron con uno de los tres diferentes subtipos de virus coadyuvante, incluyendo el subtipo parental (H3N8) o H2N2 o H1N1. Se llevaron a cabo pases seriados en el cultivo celular. Se encontró que eran necesarios al menos 150 nucleótidos en el extremo 5' del ARN del virus DI para el pase seguro *in vitro* en cada una de las líneas celulares utilizadas junto con los virus coadyuvantes particulares usados.

No ha sido posible dilucidar experimentalmente el proceso por el cual los virus de influenza A DI no clonados reducen el rendimiento de virus infeccioso, inhiben la citopatología inducida por el virus, y protegen a los animales de la enfermedad clínica, ya que la mayor parte de las poblaciones de virus de la influenza A DI contienen muchas secuencias de ARN defectuosas diferentes, derivadas de diferentes segmentos de genoma y con una variedad de delecciones centrales. De este modo, el contenido de ARN de tales poblaciones no clonadas de virus defectuosos no se puede reproducir con eficacia, y no ha sido posible analizar la relación entre la secuencia de ARN y la actividad antiviral.

Duhaut y Dimmock (2002, *J. Gen. Virol.* 83: 403-411) demostraron que un ARN de virus de la influenza A DI derivado de un sistema plasmídico parece comportarse auténticamente en el cultivo celular. Un plásmido (POLI-317) dio lugar a un ARN de virus DI que se replicó de forma estable *in vitro* en presencia de virus coadyuvante e inhibió fuertemente la producción de virus coadyuvante en ese sistema.

Duhaut y Dimmock (2003, *Journal of Virological Methods* 108: 75-82) describieron la preparación de un virus de influenza A DI definido (es decir, clonado molecularmente) generado por completo a partir de plásmidos que se utilizaron para transfectar células anfitrionas en cultivo. Los plásmidos utilizados codificaban el ARN DI (H3N8 o H7N7) y el virus de influenza infeccioso (A/WSN, H1N1). El virus de la influenza A DI generado de esta manera se hizo pasar una vez por huevos de pollo embrionados y después se administró a ratones en la presencia de virus coadyuvante (H1N1). El virus DI clonado se propagó intacto dentro del pulmón de ratón. El virus DI clonado (sin coadyuvante infeccioso) también se sometió a ensayo para determinar cualquier efecto protector en ratones frente a una sensibilización letal (H1N1). Se observó un cierto efecto profiláctico muy débil y de corta duración, pero esto solo retrasó la aparición de los síntomas clínicos y la muerte en los ratones.

Noble et al. (2004, *Vaccine* 22: 3018-3025) informaron de un estudio *in vivo* en ratones utilizando una preparación de virus de influenza A DI (EQV H3N8) de origen natural (es decir, heterogénea y no definida). Se encontró que la administración de esta preparación de virus DI a los ratones generaba protección por profilaxis durante un período, y al mismo tiempo convirtió una infección de otro modo letal en una infección a virulenta e inmunizante.

Dimmock y Marriott (2006, *Journal of General Virology* 87: 1259-1265) describieron una anomalía aparente en la que una preparación de virus de influenza DI heterogénea y no definida protege sólidamente a los ratones de la infección mortal causada por los virus A/PR/8/34 (H1N1) y A/WSN/40 (H1N1), pero protege solo marginalmente de la enfermedad causada por A/Japan/305/57 (A/Jap H2H2). Se encontró que A/Jap requería 300 veces más unidades infecciosas para causar la enfermedad clínica en ratones que A/PR8. Las proporciones de virus DI y virus de sensibilización se hicieron variar y se sometieron a ensayo. Una conclusión fue que la eficacia del virus DI depende de la dosis infecciosa del virus de sensibilización en lugar de su dosis causante de enfermedad.

Mann et al. (2006, *Vaccine* 24, 4290 a 4296) sometieron a ensayo ARN de A/EQV DI heterogéneos e indefinidos que habían sido rescatados por A/PR8 en hurones. Se administró virus de la influenza A DI en dos dosis seguidas de sensibilización con A/Sidney 5/97 infeccioso (H3N2). Los hurones tratados con el virus DI mostraron solo síntomas clínicos ocasionales y leves, en comparación con los animales de control que se pusieron gravemente enfermos.

En el documento US2006/0057116 A1 (Kawaoka y Neumann) se describen plásmidos y un método de transfección y cultivo de células para producir la virus de influenza A recombinante *in vitro* en ausencia de cualquier virus ayudante. Específicamente, los virus de influenza A se pueden preparar completamente a partir de sus ADNc clonados en líneas celulares transfectadas. Las mutaciones se pueden incorporar en cualquier segmento del gen.

El documento WO2006/051069 (Solvay Pharmaceuticals y Erasmus University) describe partículas de virus de la influenza condicionalmente defectuosas y un método para elaborarlas. Desde el punto de partida de que las células transfectadas no son capaces de producir grandes cantidades de partículas de virus de la influenza defectuosas para su uso como vacunas, la memoria ilustra un método alternativo. El método implica una célula transfectada con plásmidos que codifican siete segmentos de ARN del virus de la influenza, pero que carecen de un octavo segmento que expresa una proteína polimerasa. La célula incluye un segundo plásmido de expresión que porta la secuencia del gen de la polimerasa ausente. En la expresión, la célula transfectada produce partículas de virus "condicionalmente" defectuosas, que solo puede replicarse en una línea celular que expresa el gen de la proteína polimerasa que no está presente en el genoma defectuoso. Las partículas de virus de la influenza defectuosas solo pueden replicarse una vez en animales o células anfitriones adecuados, aunque no complementados. Las partículas de virus condicionalmente defectuosas están destinadas para su uso en vacunas o con fines de liberación génica y de ese modo ventajosamente las preparaciones de partículas de virus son incapaces de replicarse en las células normales y no contienen virus de tipo salvaje o coayudante.

Aunque se ha descrito un sistema prototipo (véase Duhaut y Dimmock, 2003 *supra*) para preparar un virus de influenza A DI clonado (que resultó ser solo débilmente protector en una ocasión, en ratones), éste no ofrece una ruta práctica para la preparación de las cantidades necesarias de los virus DI clonados requeridas para investigaciones de laboratorio adicionales, y mucho menos la cantidad de virus DI clonado que sería necesaria rutinariamente con el fin de llevar a cabo ensayos clínicos en seres humanos o animales o proporcionar la profilaxis y/o terapia en situaciones rutinarias, epidémicas o pandémicas.

Huang, A.S. y Baltimore, D. (1970) "Defective viral particles and viral disease processes" *Nature* (Lond) 226, 325-327. En este artículo de reseña describe en la página 325 cómo se logra la síntesis de partículas DI por las células o tejidos de animales en la infección con altas multiplicidades (o pase de virus no diluido) para el virus de la fiebre del Valle del Rift, el virus de la estomatitis vesicular, el virus de la peste aviar, el virus de simio 40, el virus del polioma, el virus de la coriomeningitis linfocítica, el virus Sendai, el virus de simio 5, y el virus de la polio.

Holland, J.J. (1990) "Defective viral genomes" In *Virology*, 2^a ed. págs. 151-165. Editado por B.N. Fields y D.M. Knipe. Nueva York: Raven Press. En este artículo de reseña, en la página 155 se describe cómo el pase no diluido seriado de virus en cultivo celular (o huevos o animales) es todavía el método de elección para la generación de partículas DI de cualquier virus.

Nayak, D.P., Chambers, T.M. y Akkina, R.K. (1985) "Defective-interfering (DI) RNAs of influenza viruses: origin, structure, expression and intereference" *Current Topics in Microbiology and Immunology* 114, 103-151 es un artículo de reseña que da fe de la producción de virus DI mediante pase no diluido independiente de virus.

El documento WO2007/135420 (Universidad de Warwick) describe un método para producir cantidades anteriormente no disponibles y suficientes de virus de la influenza A DI clonado para uso experimental o clínico en la prevención o el tratamiento de infección por influenza A en seres humanos o animales, incluyendo aves. También se describe el uso médico de influenza A DI clonado como tratamiento profiláctico o terapéutico de la infección por influenza A. El virus de influenza A DI clonado se identifica por tener un efecto antiviral sobre las mismas o diferentes cepas de influenza A infecciosa.

Existe una continua necesidad de proporcionar tratamientos antivirales contra la gama de infecciones por virus en seres humanos y animales, concretamente contra virus en los que no existen tratamientos antivirales disponibles, contra virus que exhiben una rápida mutación o contra virus que pueden convertirse en resistentes a los medicamentos antivirales existentes y contra virus recientemente descubiertos o mal caracterizados.

Los autores de la presente invención han hecho un descubrimiento inesperado que es que el virus de la influenza A humano clonado protege contra la infección por un virus diferente (heteróloga). Más concretamente, los autores de la presente invención han encontrado que el virus de influenza A DI humano protege a los ratones sometidos a una sensibilización letal por virus de la neumonía de ratones (PVM). Los autores de la presente invención también han descubierto sorprendentemente que virus de influenza A DI clonado es capaz de proteger a los ratones frente a la sensibilización letal con el virus de la influenza B infeccioso. Este es un hallazgo inesperado, ya que, a pesar de que los virus de la influenza A y B pertenecen a géneros separados dentro de la misma familia de virus, estos no interactúan genéticamente.

Los autores de la presente invención hicieron un descubrimiento inesperado, adicional, que es que el virus de influenza A DI clonado administrado a ratones da como resultado una estimulación de la producción de interferón natural. Sin desear estar ligado a ninguna teoría concreta, los autores de la presente invención creen que un mecanismo por el cual los virus DI clonados pueden ejercer su efecto antiviral contra virus heterotípicos es mediante la estimulación de la producción localizada de interferón natural en el sitio de la administración del virus DI clonado.

En consecuencia, en un aspecto, la presente invención proporciona virus de interferencia defectuoso (DI) humano clonado, 244/PR8 para su uso en la prevención o el tratamiento de una infección o enfermedad en un individuo, en donde la infección o enfermedad está causada por un virus distinto del de la influenza A, en donde la infección o enfermedad es causada por un virus respiratorio.

5 Los virus DI clonados incluyen aquellos que tienen ARN de hebra sencilla, así como aquellos que tienen ARN de doble hebra, ADN de hebra sencilla o ADN de doble hebra.

10 Un virus diferente del virus del cual deriva el virus DI es preferiblemente una cepa de tipo salvaje de otro virus. Por ejemplo, si el virus DI es un virus de influenza A DI, en ese caso, el virus diferente es el virus sincitial respiratorio humano (HRSV).

15 Los materiales de virus DI clonado para su uso en la invención son preferiblemente sustancialmente uniformes en términos de la secuencia de ácido nucleico ADN o ARN. La uniformidad puede ser más que un porcentaje en el intervalo de 95 a 99,9% y se puede proporcionar una uniformidad genética de 100%, tal como se mide por el % de identidad de secuencia.

20 Los tratamientos preventivos (profilácticos) y terapéuticos (es decir, después de la infección cuando los síntomas clínicos son manifiestos) son posibles dentro del alcance de la invención. El tratamiento terapéutico se puede administrar cuando se sospecha que una infección viral es todavía sub-clínica.

La infección o la enfermedad que va a ser prevenida o tratada de acuerdo con la invención es una que está causada por un virus respiratorio.

25 Dicha infección o enfermedad puede ser causada por un virus *Paramyxoviridae*, tal como un *Pneumovirus*, p. ej., el virus sincitial respiratorio humano (HRSV).

La infección o enfermedad puede ser causada por *Metapneumovirus*, p. ej., metapneumovirus humano (hMPV).

30 En otros aspectos de la invención, la infección o enfermedad puede ser causada por un virus *Orthomyxoviridae*, tal como el virus de la influenza B o el virus de la influenza C.

35 El virus causante de la infección o la enfermedad puede ser uno infeccioso contra seres humanos y otros animales (incluyendo aves, reptiles o anfibios).

De acuerdo con la invención, el virus DI clonado se puede administrar a través de la nariz y/o a través de los pulmones de un individuo humano o animal. Alternativamente, el virus DI clonado se puede administrar parenteralmente, p. ej., por vía subcutánea, por vía intramuscular, por vía intravenosa o por vía intraperitoneal.

40 También se describe un método para estimular la inmunidad innata y la producción de interferón natural por una célula, tejido, órgano, o en un ser humano o en un animal, que comprende administrar una cantidad inductora de interferón de un virus de interferencia defectuoso (DI) a la célula, tejido, órgano, ser humano o animal, a condición de que el virus DI no sea un virus de ARN con estructura de ARN con copia de respaldo "copyback" o reversión "snapback" cuando el virus DI se administra a una célula en cultivo celular.

45 La estimulación de la producción de interferón natural es fácilmente medida por la persona experta en la técnica usando los análisis conocidos. El interferón producido puede ser de cualquiera de los interferones de tipo I inducibles naturalmente; es decir interferón (IFN) de tipo I y principalmente IFN- α e IFN- β (Theofilopoulos, A.N., Baccala, R., Beutler, B. y Kono, D.H. 2005 Type I interferons (α/β) in immunity and autoimmunity. Annual Review of Immunology 23, 307-336).

50 Para la estimulación de la inmunidad innata y la producción de interferón natural, el virus DI es preferiblemente un virus DI clonado. Más concretamente, la estimulación de interferón natural puede emplear un virus coayudante de replicación competente en el anfitrión. En otras de tales realizaciones el virus DI clonado puede ser una cepa de virus diferente o puede ser heterotípica con respecto al virus coadyuvante.

60 Cuando se estimula la producción de interferón, la administración de virus DI debe tener lugar antes del efecto antiviral deseado. Esto es porque hay un retraso entre la administración y la reacción del organismo por medio de la cual las células generan el interferón. Normalmente se observa un retraso de 24 horas y por lo tanto la administración es preferiblemente aproximadamente 24 horas o más antes del nivel deseado de producción de interferón.

También se describe un método de prevención o tratamiento de una infección viral en un individuo humano o animal individual, que comprende administrar una cantidad inductora de interferón de un virus de interferencia defectuoso (DI) al individuo.

5 En tales métodos el virus DI se administra preferiblemente a través de la nariz y/o a través de los pulmones del individuo, aunque es posible la administración parenteral, p. ej. subcutánea, intramuscular, intravenosa o intraperitoneal.

10 De acuerdo con los métodos antes mencionados, el virus DI no se puede administrar directamente a un individuo, pero, adicionalmente, o alternativamente, se pueden aislar células, tejidos u órganos del organismo humano o animal, es decir, *ex vivo* y/o *in vitro*, tratar con el virus DI con el fin de inducir la producción de interferón, y después reintroducir o volver trasplantar en el organismo del mismo u otro individuo receptor o el mismo o un tipo similar de tejido o sangre.

15 De acuerdo con todos los aspectos de la invención definidos anteriormente, el virus DI es un virus de influenza DI, que es un virus de influenza A DI 244/PR8.

20 Por tanto, los autores de la presente invención proporcionan antivirales y tratamientos antivirales basados en virus de interferencia defectuosos que tienen la capacidad de proteger contra la infección por virus heterotípicos (es decir, diferentes) en cualquier anfitrión. Por ejemplo, en el tratamiento de infecciones virales pulmonares, el medicamento antiviral se libera preferiblemente por medio de administración intranasal a las células del tracto respiratorio. Otras rutas de administración pueden incluir la cavidad mucosal, pulmonar y oral. Otras rutas incluyen ruta gastrointestinal a través de la administración oral.

25 Una ventaja del virus DI clonado es que un individuo que se sabe o se sospecha que está infectado con cualquier virus puede ser tratado de la infección, aunque los síntomas de la infección aún tengan que ser observados o se tenga que diagnosticar la infección. Se puede administrar al individuo el medicamento con el virus DI clonado tan pronto como sea posible cuando se sospecha de una infección. Los individuos también se pueden tratar tan pronto como sea posible después de haber estado en contacto con otros individuos de la misma o de diferentes especies y
30 que se sabe o se sospecha que están infectados con el virus. Ventajosamente, no se cree que la protección implique una respuesta inmunitaria adaptativa y se consigue en la administración del medicamento con virus DI clonado solo, sin la necesidad de la administración de virus coadyuvante infeccioso. Por lo tanto, no hay ningún requisito para administrar el virus DI clonado antes de la infección en forma de una vacuna convencional (que se basa en las respuestas inmunitarias dirigidas por células B y células T con el fin de generar un efecto de protección), a pesar de
35 que es ventajoso un tratamiento previo de 24 horas con el virus DI.

Los medicamentos de acuerdo con la invención se pueden administrar a los individuos sobre una base preventiva.

40 El individuo al que se puede administrar el medicamento puede ser un animal o un ser humano, preferiblemente en donde el animal se selecciona entre un cerdo, caballo, perro, gato o ave (salvaje o doméstico). En el caso de las aves, ya sean salvajes o domésticas, el medicamento se puede administrar convenientemente a través del tracto oral, p. ej., mediante la incorporación del medicamento en el agua de bebida o en el alimento. En el caso de las especies de aves, las especies domesticas preferidas incluyen, por ejemplo, pato, ganso, pavo o gallina, p. ej. pollos de engorde.
45

Un régimen de dosificación de acuerdo con la invención puede consistir en una sola dosis de medicamento. La cantidad de virus DI clonado en un medicamento se puede medir por RT-PCR cuantitativa. Se emplean sondas y/o cebadores específicos para el segmento de ARN o ADN suprimidos.

50 La cantidad de virus DI clonado en un medicamento puede ser del orden (por dosis) de 1 ng -10 µg del virus (medido en términos de proteína total de virus). La cantidad de virus DI puede estar en el intervalo de 0,05 µg-10 µg. Las realizaciones preferidas incluyen 0,01-0,1 µg, 0,01-1 µg o 0,01-10 µg de proteína del virus, más preferiblemente 10 ng, 100 ng, 1 µg o 10 µg de proteína del virus.

55 Cuando se utiliza virus de influenza A DI clonado como base de un medicamento de acuerdo con la invención, la cantidad de virus DI clonado en el medicamento puede estar en el intervalo por dosis de 0,05 a 5000 UHA, preferiblemente un intervalo seleccionado entre 0,1-100, 0,5-50 o 1-10 UHA. Otros intervalos posibles incluyen 0,05-10 UHA, 0,1-50 UHA, 1-100 UHA y 1-5000 UHA.

60 La cantidad de virus DI clonado, tanto si se mide en términos de UHA o en µg de proteína de virus por dosis, se puede variar en función del sujeto. Por ejemplo, un caballo puede requerir 4x la dosis humana, mientras que un ave puede requerir 1/10 de la dosis humana.

Es la presente memoria se describe que el ácido nucleico defectuoso en el virus DI clonado puede tener al menos una delección en comparación con el segmento genómico del que deriva, aunque se puede producir una multiplicidad de porciones suprimidas de segmento 1. Las delecciones pueden estar separadas por una multiplicidad de nucleótidos contiguos. La secuencia del ácido nucleico defectuoso puede contener uno o más cambios de nucleótidos en comparación con el segmento genómico del que deriva. Estos pueden comprender una sustitución de nucleótidos diferente, un nucleótido suprimido o un nucleótido adicional insertado.

Los extremos 5' y 3' del segmento genómico que incluye la delección están preferiblemente intactos. En una realización más preferida, el segmento es el segmento 1. El efecto de la delección es que es el extremo 5' del segmento de ARN del virión tiene al menos 150, 200 o 220 nucleótidos. Preferiblemente, el extremo 5' del segmento tiene un número de nucleótidos en el intervalo de 150-500, más preferiblemente 150-250, o 150-220.

En términos del extremo 3', las porciones restantes (no suprimidas) comprenden al menos 20, 50, 100, 200, 300, 400 o 500 nucleótidos. El extremo 3' del segmento 1 puede tener un número de nucleótidos (no eliminados) en el intervalo de 20-600, 30-550, 40-500, 50-450, 60-400 o 75-250.

La delección del segmento puede ser de al menos 50% de los nucleótidos, preferiblemente al menos 75%, más preferiblemente al menos 80% de los nucleótidos. Con el fin de una eliminación eficaz en el segmento de ARN, se puede suprimir al menos un nucleótido. En realizaciones más preferidas, las delecciones pueden consistir en al menos 3, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 750, 1000, 1500, 3000 o 5000 nucleótidos, preferiblemente nucleótidos contiguos. Es posible una multiplicidad de delecciones dentro del mismo ARN.

Por lo tanto, la invención proporciona una composición farmacéutica para tratar una infección viral en un individuo humano o animal, que comprende un virus DI clonado 244/PR8, en donde la infección viral es por un virus respiratorio que no sea distinto de la influenza A.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención, adecuadas para la administración, comprenden el virus DI, en soluciones, suspensiones, y emulsiones acuosas o no acuosas, estériles. Las composiciones pueden comprender adicionalmente agentes coadyuvantes o excipientes, como es conocido en la técnica, véase, p. ej., Berkow et al., *The Merck Manual*, 16ª edición Merck & Co., Rahman, NJ (1992), *Avery's Drug Treatment: Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, tercera edición, ADIS Press, Ltd., Williams y Wilkins, Baltimore, MD (1987) y Osol (ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, PA 1324-1341 (1980). La composición de la invención se presenta preferiblemente en forma de dosis individuales (dosis unitarias).

Las formas de dosificación líquidas para administración oral pueden comprender generalmente una solución de liposomas que contiene la forma de dosificación líquida. Las formas adecuadas para la suspensión de liposomas incluyen emulsiones, suspensiones, soluciones, jarabes, y elixires que contienen diluyentes inertes comúnmente usados en la técnica, p. ej., agua purificada. Además de diluyentes inertes, las composiciones ilustrativas pueden incluir también coadyuvantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, o agentes edulcorantes, saborizantes, o perfumantes.

Cuando se utiliza una composición o medicamento de la presente invención para su administración a un individuo, ésta puede comprender adicionalmente sales, tampones, u otras sustancias que son deseables para mejorar la eficacia de la composición.

Las composiciones o medicamentos preferidos son, para la administración por la mucosa. De las diversas opciones de liberación en la mucosas disponibles, la ruta intranasal es la más práctica, ya que ofrece un fácil acceso con dispositivos relativamente simples que ya han sido producidos en masa. La composición de la invención está por lo tanto adaptada y/o empaquetada preferiblemente para la administración intranasal, tal como mediante pulverización nasal, gotas nasales, gel o polvo (véase Almeida y Alpar (1996) *J. Drug Targeting* 3: 455-467 y Agarwal y Mishra (1999) *Indian J. Exp. Biol.* 37: 6-16).

Otras rutas posibles para la liberación por la mucosa incluyen la ruta oral, intragástrica, pulmonar e intestinal. La composición de la invención puede ser adaptada y/o envasar para administración en la mucosa (p. ej., véanse Walker (1994) *Vaccine* 12: 387-400, Clements (1997) *Nature Biotech.* 15: 622-623 y McGhee et al. (1992) *Vaccine* 10: 75-88). Para la administración oral se pueden proporcionar comprimidos o cápsulas (opcionalmente con recubrimiento entérico).

Opcionalmente, líquido, material de plantas transgénicas, gotas, inhalador, aerosol, recubrimiento entérico, supositorio, pesario, etc. (véase Michetti (1998) *J. Gastroenterol. [Suppl X]*: 66-68 y capítulo 17 de *Vaccine design: the subunit and adjuvant approach*, eds. Powell y Newman, Plenum Press 1995).

La composición de la invención se puede administrar por medio de una ruta parenteral. La ruta parenteral incluye la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, epicutánea/transdérmica, o intraperitoneal. Se pueden utilizar diferentes tipos de formulaciones parenterales, incluyendo soluciones, dispersiones micelares, emulsiones, complejos de inclusión (ciclodextrinas), liposomas y suspensiones.

Cualquiera que sea la ruta de liberación utilizada, las composiciones o medicamentos de la invención están preferiblemente en forma de dosificación unitaria. Las dosis eficaces pueden establecerse de forma rutinaria. Por ejemplo, una dosis humana típica de la composición para inyección o para uso intranasal tiene un volumen de entre 0,1-0,5 ml p. ej., dos pulverizaciones de 100 µl, una por cada orificio nasal.

Las composiciones de la invención son preferiblemente estériles y, preferiblemente, no pirogénicas. A concentraciones más altas, una composición de virus influenza A DI puede ser pirogénica o mostrar una actividad pirogénica residual. Las composiciones están preferiblemente tamponadas, p. ej. entre un pH 6,5 y un pH 8, por lo general alrededor de pH 7.

Una forma ventajosa de administración nasal se describe en el documento WO2006/041819 (Medimmune).

También se describe un método de conversión de un virus virulento que infecta a un sujeto en una infección por virus no virulento, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un virus DI clonado.

La partícula de virus DI clonado se puede administrar antes, simultáneamente o después de la infección.

También se describe un método de conversión de un virus virulento que infectar a un sujeto en una infección por virus no virulento que vacuna al sujeto contra el virus infectante, que comprende administrar al sujeto un virus de la influenza DI clonado.

El sujeto puede estar, o se puede sospechar que está, infectado con un virus dado. En los casos de una infección real o incluso sospechada, se puede administrar el virus DI clonado tan pronto como sea posible, en un plazo de 48 horas, preferiblemente en un plazo de 24 horas desde que el individuo se ha infectado, o se sospecha que se ha infectado. De un modo similar, se puede administrar a los individuos el virus DI clonado como una medida de precaución, si hace poco que ha estado expuesto al virus infeccioso, ya sea de seres humanos, animales o aves infectados. A las personas que tienen que hacerse cargo de cadáveres de animales o aves o de cadáveres humanos que se sabe o sospecha que están infectados con virus patogénicos, en particular en situaciones epidémicas o pandémicas se les puede administrar el virus DI clonado de la invención. A tales personas se les puede administrar el medicamento de la invención sobre una base preventiva inmediatamente antes de riesgo de exposición al virus. A diferencia del empleo de una vacuna, no es necesario conocer la identidad del virus infectante.

En cada aspecto de la invención se ha descrito anteriormente, el virus DI clonado se administra en una cantidad suficiente. El virus coadyuvante puede ser de cualquier de cepa de virus correspondiente, ya sea de seres humanos o de otros animales, incluyendo aves.

El virus DI clonado también protege cuando se administra hasta 24 horas después de la infección y más allá. Por lo tanto, es capaz de contrarrestar una infección real. Por lo tanto, también se puede utilizar como un tratamiento para contactos familiares y otros contactos directos de los individuos infectados.

El virus DI clonado es fácil de administrar. Una gota de solución salina que contiene el virus DI clonado puede ser aplicado simplemente a chorro por la nariz. La administración en aerosol, ya utilizada para algunas vacunas, ofrece otra ruta sencilla de administración. El virus DI clonado proporciona un tratamiento útil para los animales domésticos, p. ej., a través del agua potable.

La invención se describirá ahora en detalle con referencia a los Ejemplos y a los dibujos en los que:

La Figura 1 es una fotografía de un gel que muestra la RT-PCR de ARN 244 contenido en fluidos alantoideos de huevos inoculados con mezclas de influenza A DI 244/PR8 y de influenza B infecciosa como se describe en las Tablas 1 y 2. M = marcador de ADN; A = 1/10 DI + B/Lee; B = 1/100 DI + B/Lee; C = 1/1000 DI + B/Lee; D = 1/10.000 DI + B/Lee; E = B/Lee; F = 1/10 DI; G = solución salina.

La Figura 2A es un diagrama de datos que muestra el efecto de diferentes dosis de PVM sobre ratones C3H/He-mg (4 ratones por grupo).

La Figura 2B es un diagrama de datos que muestra el efecto de diferentes dosis de PVM sobre ratones BALB/c (4 ratones por grupo).

La Figura 3 es un diagrama de datos que muestra el efecto protector de virus de influenza A DI no diluido frente a la sensibilización con PVM en ratones C3H/He-mg.

La Figura 4 es un diagrama de datos que muestra el efecto protector de virus de influenza A DI diluido frente a la sensibilización con PVM en ratones C3H/He-mg.

La Figura 5 es un diagrama de datos que muestra la longevidad de la protección mediada por virus de influenza A DI frente a la sensibilización con PVM en ratones C3H/He-mg. Los ratones fueron sensibilizados 6 días después del tratamiento con virus de influenza A DI.

5 La Figura 6 es un diagrama de datos que muestran el nivel de virus de influenza A DI al cual se proporciona protección frente a la sensibilización con PVM en ratones C3H/He-mg.

La Figura 7 es un diagrama de datos adicionales procedentes de otro experimento que muestra el nivel de virus de influenza A DI al cual se proporciona protección frente a la sensibilización con PVM en ratones C3H/He-mg.

10 La Figura 8 es un diagrama de datos adicionales procedentes de otro experimento que muestra la duración de la protección conferida. Los ratones se sensibilizaron con PVM 1 o 3 días después del tratamiento con virus de influenza A DI, según se indica.

La Figura 9 es un diagrama de datos que muestra cómo cambian los pesos de los grupos de ratones con el tiempo en respuesta al tratamiento con virus de influenza A DI antes o después de la sensibilización con PVM.

15 La Figura 10 muestra los resultados de un análisis para interferón llevado a cabo en muestras de pulmón (L) y suero (S) 1 día después de la inoculación intranasal en ratones con virus de influenza A DI puro. La DO de las células teñidas con rojo neutro se leyó 6 días después de la infección. 'Virus' se refiere a la presencia de virus del Bosque de Semliki en el análisis.

La Figura 11 muestra una curva de titulación de interferón beta de control en la misma placa de microtitulación utilizada para la Figura 10 y la Tabla 10.

20 La Figura 12 muestra una curva patrón para las mediciones de interferón beta de control en la misma placa de microtitulación que da lugar a los valores de la Tabla 15.

Los autores de la presente invención han llevado a cabo experimentos y han encontrado inesperadamente que algunos virus de influenza A DI proporcionan a los ratones un grado de protección contra las infecciones de influenza B. Se encontró que el orden de eficacia de los virus DI sometidos a ensayo contra la influenza B era:

25 **244/PR8=220/Vic>220/PR8**

es decir, 244/PR8 y 220/Vic y son más eficaces que 220/PR8.

Considerando que el orden de eficacia de los virus DI contra la influenza A (véanse la Tablas 1 y 2 de más abajo) es:

30 **244/PR8>220/Vic=317/Vic>220/PR8**

es decir, 244/PR8 y 220/Vic son los más eficaces contra los virus tanto de la influenza A como de la influenza B y 220/PR8 es el menos eficaz. Los ensayos con 317/Vic no están completos.

Sin embargo, se administró cuando virus de influenza A DI 24 horas antes de la infección con el virus de la influenza B se encontró que el orden de la eficacia de los virus DI contra la influenza B era:

35 **244/PR8>220/PR8**

es decir, en estas condiciones 244/PR8 es de nuevo el más eficaz y 220/PR8 el menos eficaz.

Tabla 1. Resumen de la protección por virus de la influenza A D1 244/PR8 y 244/WSN contra A/WSN: se resalta la menor dosis eficaz

UHA/ Ratón	Proteína de virus/Ratón	Dilución	244/PR8						244/WSN	
			793	797	804	812	813	808		
4000	12 µg	1/1	3477	3563	Nr	Nr	3903	++++	Nr	
			3528	++++	++++	++++	++++	++++		
400	1 µg	1/10	3487	3563	3640*	3704	3885	++++	3667**	
			++++	++++	++++	++++	++++	++++		
			3903	++++	++++	++++	++++	++++		
			3907	++++	++++	++++	++++	++++		
40	120 ng	1/100	3498	3563	3640	3704	3718	++	3667	
			3512	++++	++++	++++	3884	++	3676	
			3584	+++	3676	3687	3895	++	3676	
			++++	++++	++++	++++	3903	++	3676	
4	12 ng	1/1000	3512	Nr	3640	3704	3718	-	3667	
			+	+	3676	+	3895	++	3676	
0.4	1 ng	1/10000	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	3667	

793, 797, 804, 812 y 813 son todas preparaciones independientes pero equivalentes de 244/PR8

*Nueva titulación de WSN: 640X; ** Nueva dilución y titulación de WSNa.

Nr, No realizado

Tabla 2: Resumen de la protección por los virus de la influenza A DI 220/Vic, 220/PR8 y 317/Vic contra A/WSN: se resalta la menor dosis eficaz

UHA/Ratón	Proteína de virus/Ratón	Dilución	220/Vic		220/PR8	317/Vic
			792	798		
4000	12 µg	1/1	3415	3588	794	796
			3527	+++	+++	+++
400	1 µg	1/10	3498	3588	+	+++
			3892	+++	-	+++
40	120 ng	1/100	3892	-	3511	+
4	12 ng	1/1000		Nr	Nr	Nr
0,4	1 ng	1/10000		Nr	Nr	Nr

Nr. No realizado

5 Se encontró que la protección de la influenza B requería 100 veces más influenza DI de lo que se requería para proteger contra la infección por influenza A (véase la Tabla 6). La influenza B tiene una $DI_{50}:DL_{50}$ similar a la de los virus de influenza A utilizados, y por lo la baja eficacia de la influenza A DI no parece estar debida a una dosis demasiado alta de virus de sensibilización de la influenza B.

10 Es poco probable que los ARN DI de influenza A inunden la infección por influenza B por la más rápida replicación del ARN DI pequeño ya que no se sabe que los virus de influenza A y B interactúen genéticamente. Por ejemplo, todos los intentos para elaborar virus híbridos de influenza A x influenza B (recombinantes) han fracasado. Además los autores de la presente invención han encontrado que la influenza B no soporta la replicación del ARN 244 DI de la influenza A.

También se han encontrado que los virus DI activos protegen a los ratones de B/Lee mediante la estimulación de interferones alfa/beta en el tracto respiratorio y los autores de la presente invención han encontrado que:

(a) La influenza A DI protege a los ratones de la infección con el virus de la neumonía heterólogo de ratones (PVM) en el ratón.

(b) La influenza A DI intranasal (sin virus coadyuvante infeccioso y sin virus de sensibilización) estimula el interferón en los pulmones de los ratones, como se demuestra mediante un bioanálisis antiviral *in vitro*.

Una centésima parte de la dosis de influenza A DI, que protege a los ratones de B/Lee también protege a los ratones de influenza A. Esto sugiere que el interferón alfa/beta no es esencial a la protección contra la influenza A - esto es corroborado por el hallazgo de que los ratones mutantes que carecen de actividad interferón alfa/beta (debido a que carecen de receptor interferón alfa/beta) están protegidos de la influenza A por la influenza A DI.

En la protección de ratones contra PVM, los ratones se inoculan con virus de influenza A DI 24 h antes de la sensibilización con el virus. El virus de influenza A DI fue igualmente eficaz contra la infección por influenza B cuando se inoculó 24 h antes de la sensibilización con el virus. Sin embargo, cuando se inocularon al mismo tiempo virus de influenza A DI y virus de la influenza B, se requirió una mayor concentración 10 veces mayor de virus de influenza A DI para efectuar el mismo grado de protección.

Algunos otros virus DI (virus de la estomatitis vesicular, un rhabdovirus y el virus Sendai, un paramixovirus) son conocidas por estimular el interferón alfa/beta *in vitro*. Sin embargo, estos son todos ARN de reversión - es decir, los ARN de hebra sencilla cuyas mitades 3' y 5' son complementarias (véase Marcus, P.I. y Sekellick, M.J. (1977) *Nature* (Lond) 266, 815-819; Sekellick, M.J. y Marcus, P.I. (1982) *Virology* 117, 280-285; Marcus, P.I. y Gaccione, C. (1989) *Virology* 171, 630-633; Strahle, L., Garcin, D. y Kolakofsky, D. (2006) *Virology* 351, 101-111.

Se puede utilizar una variedad de otros virus DI distintos de los virus DI de influenza A para inducir interferón en animales y células. Preferiblemente, tales virus DI se clonan y no son de reversión ni de copia de respaldo. Por ejemplo, existen varios virus DI clonados que pertenecen al género *Alphavirus* de la familia *Togaviridae*, y específicamente al virus Sindbis y al virus del Bosque Semliki (SFV). Todos ellos son similares en estructura pero difieren en la secuencia. Los virus DI SFV han sido sometidos a ensayo para determinar su capacidad para proteger a los animales. Los virus DI SFV DI-6 y DI-19 han sido clonados ambos [véase Thomson, M. y N.J. Dimmock, Common sequence elements in structurally unrelated genomes of defective interfering Semliki Forest virus. *Virology*, 1994. 199: pág. 354-365; Thomson, M., C.L. White, y N.J. Dimmock, The genomic sequence of defective interfering Semliki Forest virus (SFV) determines its ability to be replicated in mouse brain and to protect against a lethal SFV infection in vivo. *Virology*, 1998. 241: págs. 215-223]. SFV tiene una sola molécula de ARN efector positivo de hebra sencilla, que comprende 11.422 nt. Los *Alfavirus* son virus de vertebrados que son transmitidos por insectos. Se replican tanto en anfitriones tanto invertebrados como vertebrados. Los virus DI Alphavirus han sido revisados [véanse Kaariainen, L. y H. Soderlund, Structure and replication of alphaviruses. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 1978. 82: págs. 15-69; Stollar, V., Defective interfering alphaviruses, in *The Togaviruses*, R.W. Schlesinger, Editor. 1980, Academic Press: Nueva York . págs. 427-457; Schlesinger, S. y B.G. Weiss, Defective RNAs of alphaviruses, in *The Togaviridae and Flaviviridae*, S. Schlesinger y M.J. Schlesinger, Editores. 1986, Plenum Press: Nueva York y Londres. págs. 149-169; Barrett, A.D.T. y N.J. Dimmock, Defective interfering viruses and infections of animals. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 1986. 128: págs. 55-84; Dimmock, N.J., The biological significance of defective interfering viruses. *Reviews in Medical Virology*, 1991. 1: págs. 165-176.3-7].

El SFV DI-19 tiene 1244 nt de longitud y tiene 10,9% del genoma del virión. El SFV DI-19 no tiene una gran región de doble hebra. En términos de actividad biológica, el virus DI-19 interfiere en el cultivo celular en la multiplicación de SFV y la replicación del ARN y protege a los ratones de la enfermedad mediada por SFV. El SFV es neurotrópico y cuando los ratones son inoculados por la ruta intranasal, el virus entra en el cerebro probablemente mediante la introducción y ascensión por el nervio olfatorio, y causa la encefalitis y normalmente una enfermedad fatal. La coadministración de SFV DI-19 con SFV protege contra tal enfermedad.

Muchos virus dan lugar a los genomas defectuosos y muchos de estos virus defectuosos serán virus de interferencia. A continuación se proporcionan una lista de ejemplos no limitantes de los virus en los que se pueden encontrar los genomas defectuosos:

Familia Herpesviridae

- *Virus del herpes simple*
- *Herpesvirus equino*
- *Seudorrabia*
- *Citomegalovirus*
- *Herpesvirus*
- *Virus de Epstein-Barr*

Familia Papovaviridae

- 5 • SV40
- Papovavirus
- Virus del polioma

Familia Baculoviridae

- 10 • Baculovirus

Familia Hepadnaviridae

- 15 • Virus de la hepatitis B
- Virus de la hepatitis B de patos

Familia Adenoviridae

- 20 • Adenovirus tipo 12
- Adenovirus de ratón

Familia Parvoviridae

- 25 • Parvovirus

En los ejemplos siguientes se utilizaron ratones bajo las Licencias de Proyectos del Ministerio del Interior PPL 40/2561 y PPL 40/2129, y Licencias Personales 30/1253 y PIL 40/03497.

EJEMPLO 1 - Demostración de que la protección mediada por virus de influenza A DI (244/PR8) de ratones frente al virus de influenza A infeccioso no depende de la inducción de interferón de tipo I

Se diseñó un experimento para determinar si la protección mediada por virus de influenza A DI de ratones frente a virus de la influenza A necesita un sistema de interferón de tipo I en funcionamiento. Se realizó un intento para proteger a los ratones mutantes que carecen del receptor de interferón tipo I. Este receptor es utilizado por todas la proteínas de interferón alfa y beta de tipo I (13 interferones alfa y 1 interferón beta).

Los ratones (tipo salvaje (129 Sv/Ev) o carentes de receptor (129 Sv/Ev IFN α / β R $^{-/-}$); Banting y Kingman Ltd, aproximadamente 5 semanas de edad) fueron infectados por la ruta intranasal con anestesia ligera con una mezcla (40 μ l) de influenza A/WSN (10 DL $_{50}$) mezclado con virus de influenza A DI 244/PR8 (400 UHA, 1,2 μ g, Núm. 813). Se utilizaron 5 ratones por grupo infectado y dos ratones para los grupos inoculados con virus DI solo y con diluyente.

Las tablas 2 y 3 siguientes demuestran que la mayoría de los ratones de tipo salvaje a los que se habían administrado el virus y la influenza DI inactivada enfermaron, perdió peso y murieron, mientras que aquellos a los que se habían administrado el virus y la influenza A DI activa permanecieron clínicamente bien a pesar de que su aumento de peso fue menor que el de los ratones a los que se había inoculado DI o diluyente de control durante 5-8 días.

Tabla 2. Cambio de peso porcentual en ratones de tipo salvaje inoculó por la ruta intranasal con virus de influenza A DI y virus de influenza A infeccioso

Días	iDI + V	DI + V	DI	Simulado
0	0	0	0	0
1	0	0	0	2,7
2	3,4	4	6,1	5,4
3	6,7	6,1	9,1	8,1
4	9	12,1	12,1	16,2
5	0	10,1	12,1	10,8
6	-5,6	10,1	18,2	13,5
7	-22,5	8,1	18,2	16,2

Días	iDI + V	DI + V	DI	Simulado
8	-25,8	10,1	21,2	18,9
9		13,1	24,2	16,2
10		16,2	24,2	21,6
11		20,2	27,2	27
sobrevivientes	20%	100%	100%	100%

Tabla 3. Puntuación clínica en ratones de tipo salvaje inoculados por la ruta intranasal con virus de influenza A DI y virus de influenza A infeccioso

Días	iDI + V	DI + V	DI	Simulado
0	1*	1	1	1
1	1	1	1	1
2	1	1	1	1
3	1	1	1	1
4	1,6	1	1	1
5	1,8	1	1	1
6	2,7	1	1	1
7	3	1	1	1
8	3,4	1	1	1
9	4,2	1	1	1
10	4,2	1	1	1
11	4,2	1	1	1
sobrevivientes	20%	100%	100%	100%

*1 = bien, 5 = muerto

5 Las tablas 4 y 5 siguientes demuestran que todos los ratones que recibieron virus y virus de influenza A DI inactivado enfermaron, perdieron peso y murieron. De aquellos que recibieron virus y virus de la influenza A DI activo solo una minoría (2/5) mostró alguna enfermedad clínica y ésta fue extremadamente leve y transitoria.

10 **Tabla 4.** Cambio de peso porcentual en ratones carentes de receptor interferón inoculados por la ruta intranasal con virus de influenza A DI y virus de influenza A infeccioso

Días	iDI + V	DI + V	DI	Simulado
0	0	0	0	0
1	0	-2	2,8	2,6
2	3	1	5,6	5,1
3	-4	4,1	8,3	7,7
4	-11,1	8,2	13,9	15,4
5	-18,2	-1	11,1	12,8
6	-22,2	-4,1	11,1	15,4
7	-26,3	-6,1	13,8	12,8
8		-3,1	16,7	15,4
9		2	16,7	15,4
10		6,1	19,4	18
11		9,2	19,4	18

Días	iDI + V	DI + V	DI	Simulado
Sobrevivientes	0%	100%	100%	100%

Tabla 5. Puntuación clínica en ratones carentes de receptor de interferón inoculados por la ruta intranasal con virus de influenza A DI y virus de influenza A infeccioso

Días	iDI + V	DI + V	DI	Simulado
0	1	1	1	1
1	1	1	1	1
2	1	1	1	1
3	1,8	1	1	1
4	2,6	1	1	1
5	3,8	1,2	1	1
6	4	1,4	1	1
7	4,2	1,4	1	1
8	5	1,2	1	1
9		1	1	1
10		1	1	1
11		1	1	1
sobrevivientes	0%	100%	100%	100%

* 1 = buen, 5 = muerto

5 Los ratones perdieron peso brevemente entre los días 5-7 y después reanudaron el aumento de peso a partir del día 8. Los controles aumentaron de peso durante este período. Esta pérdida de peso en ratones mutantes fue mayor que la observada en el grupo paralelo de ratones de tipo salvaje (DI + V).

10 Los datos demuestran que el virus de influenza A DI protege sustancialmente a los ratones que carecen de un sistema de interferón de tipo I en funcionamiento frente al virus de influenza A. Sin embargo, una pérdida transitoria de peso y una enfermedad transitoria muy leve en algunos animales sugieren que el interferón de tipo I pueda hacer una pequeña contribución a la protección mediada por virus de influenza A DI.

15 El mismo resultado se encontró en otro experimento (datos no mostrados).

Ejemplo 2 - Demostración de que algunos virus de influenza A DI protegen a los ratones de la infección con influenza B/Lee - inoculación simultánea

20 El objetivo original de una serie de experimentos fue utilizar un virus de la influenza B como control negativo para demostrar que la actividad protectora de diferentes virus de influenza A de interferencia defectuosos (DI) en ratones es específica en su protección contra la influenza A en oposición con otros virus. Sorprendentemente, se encontró que influenza A DI 244/PR8 tenía actividad contra la influenza B, y que la influenza A DI era uno de los más activos de los virus DI sometidos a ensayo por unidad de HA viral total. Se desestimó que a posibilidad de que la dosis infectante de la influenza B estuviera contaminada con virus de la influenza A debido a que la transferencia Western demuestraba que los antígenos NP de la influenza B y un conocido virus de la influenza A no están relacionados.

30 El virus de sensibilización primaria fue influenza B/Lee/40 Núm. 795. La identidad de este virus se comprobó y se confirmó como influenza B por su reacción positiva con un anticuerpo patrón contra la proteína NP de la influenza B. Este anticuerpo no reaccionó con el virus de la influenza A. También se utilizó influenza A/WSN (H1N1) Núm. 640 para confirmar que la preparación DI era activa. Ambos se utilizaron a 10 DL₅₀/Ratón. Los virus se almacenaron a -70°C diluidos en PBS que contenía BSA al 0,1% (Sigma). Los virus se descongelaron a 37°C y se mantuvieron en hielo hasta su uso, por lo general en el plazo de 1 - 2 h.

35 Para el virus DI, se clonó el ARN1 DI ARN 220 en Warwick (véase Duhaut, S.D. y Dimmock, N.J. (1998). Virol 248, 241-253; Duhaut, S. y Dimmock, N.J. (2000) Virol 275, 278-285; Duhaut, S.D. y Dimmock, N.J. (2002) J Gen Virol 83, 403-411; Duhaut, S.D. y Dimmock, N.J. (2003) J Virol Meth 108, 75-82.). Los ARN se incorporaron como virus DI

(220/PR8, 220/Vic e influenza A DI (244/PR8) mediante transfección de células con plásmidos que producen la influenza infecciosa A/PR/8/34 (H1N1) o A/Victoria/3/75 (H3N2). La nomenclatura completa es:

- 220/PR8 = RNA1_220/445_A/equine/Newmarket 7339/79 (H3N8) x A/PR/8/34 (H1N1)
- 5 • 220/Vic = RNA1_220/445_A/equine/Newmarket/7339/79 (H3N8) x A/Victoria/3/75 (H3N2)
- 244/PR8 = RNA1_244/395_A/PR/8/34 (H1N1) x A/PR/8/34 (H1N1)

Este fluido de cultivo de tejido se pasó por la ruta alantoidea en huevos de pollo embrionados para elaborar una provisión de partida de siembra. Las provisiones de partida de trabajo de los virus de influenza A DI se cultivaron mediante la inoculación de los huevos con una cantidad constante de un una provisión de partida de siembra (10 µl) de la misma manera. Los huevos se incubaron a 33°C durante 2 días. Se recogieron los fluidos alantoideos y el virus DI se purificó mediante centrifugación diferencial a través de sacarosa. El sedimento de virus resultante se volvió a suspender a 2×10^5 UHA/ml en PBS que contenía BSA al 0,1% (Sigma) y se mantuvo en almacenamiento de nitrógeno líquido. La presencia y la integridad de ARN DI se confirmaron mediante RT-PCR utilizando cebadores específicos y secuenciación.

Se utilizaron varios lotes de DI. Los virus de DI se descongelaron a 37°C hasta que se fundieron y se mantuvieron sobre hielo hasta su uso, por lo general en el plazo de 1-2 h. El virus DI se irradió con UV a temperatura ambiente a 254 nm durante 40 segundos para eliminar la infectividad del virus coayudante (DI). Una alícuota del mismo material se irradió con UV de la misma manera durante 8 minutos para inactivar la actividad protectora (iDI). Esto último conserva las actividades hemaglutinina y neuraminidasa completas. Se llevó a cabo la irradiación UV en bandejas de microtitulación seleccionadas de manera que hubiera una profundidad constante de aproximadamente 1-2 mm, con independencia del volumen que se estuviera irradiando:

- placa de 6 pocillos para aproximadamente 1000 µl
- 25 placa de 12 pocillos para aproximadamente 350 µl
- placa de 24 pocillos para aproximadamente 200 µl.

La irradiación de la infectividad del virus se llevó a cabo utilizando una tira de luz UV de aproximadamente 10 cm desde la muestra y la lámpara se calentó durante unos minutos antes de su uso. Bajo la lámpara hay una cruz usada para alinear los pocillos con la lámpara. Las placas se agitaron continuamente a mano durante 40 s y de forma intermitente durante 8 min. La duración de la irradiación se determinó empíricamente mediante la irradiación de virus infecciosos bajo condiciones que imitaban la irradiación de virus DI, y la determinación de la infectividad residual. La inactivación UV de la infectividad por influenza sigue una cinética de una sola partícula "one hit kinetics" y por lo tanto la predicción se puede hacer para cualquier título de virus. Se guarda un registro de uso de la lámpara UV para asegurarse de que la lámpara se cambia antes de que su eficacia disminuya. Los ratones se inoculan de forma rutinaria con el virus DI (después de 40 segundos de UV) solo para comprobar que la inactivación fue satisfactoria.

Los ratones C3H/He-mg endogámicos fueron suministrados por la Unidad de Pequeños Animales de la Universidad de Warwick y se utilizaron a aproximadamente 4-6 semanas de edad y con 16 a 20 g. Se utilizaron ambos sexos después de haber sido demostrado que eran igualmente susceptibles a la infección con virus de influenza A. Los animales se alojaron en jaulas de un solo sexo generalmente en grupos de 4-6 animales a 19-23°C y 45-65% de humedad relativa. El alimento y el agua estuvieron disponibles de forma continua. Los ratones no fueron identificados individualmente.

Los ratones fueron infectados por la ruta intranasal con el virus después de una ligera anestesia con éter, por lo general con 40 µl en la separación entre las 2 ventanas de la nariz. Los animales recuperan la conciencia y comienzan a moverse a los pocos segundos de la inoculación. Después de la infección los ratones se evalúan diariamente, se puntúan clínicamente y se determina el peso del grupo - ambos diariamente. Se utilizó una proforma convencional (más debajo). Los criterios clínicos utilizados fueron los siguientes. Cuando se requirió éstos se puntuaron cuantitativamente en una escala de 1-5 de la siguiente manera:

- 1 punto por cada ratón sano.
- 2 puntos por cada ratón que muestra signos de malestar, incluyendo ligera piloerección, modo de andar ligeramente modificado, y aumento de la deambulación (abreviado como 'doliente' en la proforma de evaluación clínica).
- 55 ■ 3 puntos por cada ratón que muestra signos de fuerte piloerección, abdomen constreñido, modo de andar modificado, períodos de inactividad, aumento de la frecuencia respiratoria, y algunas veces estertores (abreviado como 'más doliente' en la proforma de la evaluación clínica).
- 4 puntos por cada ratón con características intensificadas del grupo anterior, pero que muestran poca actividad, y empiezan a estar moribundos; estos ratones fueron sacrificados cuando estuvo claro que no iban a sobrevivir (abreviado como 'lo más doliente' en la proforma de la evaluación clínica).
- 60 ■ 5 puntos por ratón muerto.

En estudios previos, los ratones infectados que habían sido tratados con virus DI no mostraron ningún signo de enfermedad o pérdida de peso, pero se determinó previamente que tales animales experimentaron una infección

sub-clínica, silenciosa, que estimula una respuesta inmunitaria adaptativa, que los protegía de una segunda sensibilización con una dosis muy grande del mismo virus. Con el fin de determinar el estado inmunológico de los animales después del tratamiento con el virus DI, los animales se sensibilizaron con virus infeccioso una segunda vez. Este fue B/Lee, administrado como ya se ha descrito, a las 3 semanas de la primera infección. La dosis de virus fue de aproximadamente 10.000 DL₅₀.

Los ratones se inocularon por la ruta intranasal con una mezcla de virus de influenza A DI y 10 DL₅₀ de virus de sensibilización B/Lee o A/WSN o virus de influenza A DI inactivado mezclado con 10 DL₅₀ B/Lee o A/WSN de sensibilización.

El virus de la influenza A DI inactivado contiene la misma cantidad/actividad de hemaglutinina y neuraminidasa que el virus DI activo. Tres semanas después de la primera sensibilización con B/Lee, los ratones fueron sensibilizados de nuevo con una dosis alta de B/Lee para determinar su estado inmunitario. La Tabla 6 de más abajo resume la protección observada con los diferentes virus de influenza A DI. Lo que se puede observar es que a 12 µg o 4000 UHA/ratón existe una protección fuerte y reproducible con virus de influenza A DI y 220/Vic, pero ninguna protección significativa con 220/PR8. 220/Vic fue protector utilizando 1,2 µg de virus DI por ratón. El nivel de protección con virus de influenza A DI contra de B/Lee es aproximadamente 100 veces menor que la protección que confiere contra A/WSN. La protección ofrecida por el virus de la influenza A DI contra el virus de la influenza A es significativa a 120 ng.

Las preparaciones DI protegieron contra la influenza A en diferentes grados (véanse las tablas 1 y 2 anteriores). Esto se puede resumir como:

244/PR8 >220/Vic >220/PR8

Todas las preparaciones de virus de la influenza A DI están normalizadas por UHA y el intervalo de actividad observada contra la influenza B es notable. La actividad no se corresponde con el ARN DI ya que 220/PR8 es activo mientras 220/Vic no lo es. Tampoco la actividad se correlaciona con el virus coadyuvante ya que 244/PR8 es activo mientras 220/PR8 no lo es.

Tabla 6. Protección de ratones contra la influenza B/Lee utilizando diversos virus de influenza A DI clonados. Se mezcló B/Lee con virus DI y se administró de forma simultánea a los ratones por la ruta intranasal.

Virus DI	244/PR8			220/Vic			220/PR8		
	Exp.	Núm. DI	Protección	Exp.	Núm. DI	Protección	Exp.	Núm. DI	Protección
12 mg o 1/1	3528	793 ^e	+ + + +	3527	792	+ + + +	3549	794	- ^a
	3584	793	+ + ^b	3892	798	+ + + ^d	3808	794	+ ^a
	3779	812	+ + +				4096	794	+ a
1 mg o 1/10	3584	793	± ^c	3892	798	+ + ^d	3808	794	- ^a
	4192	813	+ +						
120 ng o 1/100	3584	793	-	3892	798	- ^d			

Un control en todos los experimentos fue el virus DI inactivado mezclado con B/Lee (datos no mostrados). Éste no proporcionó ninguna protección.

^aNo se utilizó ningún control positivo WSN para la protección en este experimento.

^bEsta fue una sensibilización más fuerte de lo normal: no obstante, influenza A DI retrasó la enfermedad 4 días pesar de que todos (5/5) los ratones enfermaron, y solo 1/5 murieron (en comparación con la influenza A DI inactivada, donde 5/5 murieron el día 6). Un control positivo de 1/100 DI proporcionó una buena protección contra WSN.

^cInfluenza A DI, retrasó la enfermedad pero 4/5 murieron.

^dNingún control solo de virus en este experimento, por lo que se utilizó 1/100 DI + B/Lee que no proporcionó ninguna protección aparente.

^eNúmero de referencia del libro de soluciones de partida de virus.

+ + + +, Indica protección completa contra la enfermedad y pérdida de peso; -, ninguna protección en comparación con el virus solo, o virus + control DI inactivado; + + +, + +, +, ± son gradaciones intermedias de alta a baja protección respectivamente .

Infectividad por UHA de B/Lee

Para comprobar si la relativa falta de sensibilidad de la influenza B a la influenza A DI es el resultado de una alta razón de infectividad en ratón (MDI₅₀):DL₅₀, se llevó a cabo una titulación de B/Lee en ratones. La titulación determinó si los ratones fueron infectados (y por lo tanto la habían adquirido inmunidad) mediante sensibilización 3 semanas después de la primera infección con una dosis alta de virus homólogo. Se determinó la DL₅₀ de la manera habitual. Sólo hubo 20 MDI₅₀/LD₅₀ (véase el Núm. 3846). Esto significa que la dosis infecciosa era solo 20 veces mayor que la dosis letal y se encontraba dentro del gama de virus de influenza A que comúnmente se utilizan para sensibilizar ratones. Por lo tanto la dosis de la influenza B no fue excesiva.

Los ratones protegidos desarrollan inmunidad adaptativa

Los ratones que sobrevivieron a la primera sensibilización con B/Lee a través de la administración del virus DI fueron protegidos de una segunda sensibilización de alto nivel con B/Lee, demostrando que habían desarrollado una inmunidad adaptativa contra B/Lee (datos no mostrados).

Ejemplo 3 - Dilucidación de la naturaleza de la protección mediada por el virus de la influenza A DI de ratones frente a la infección con el virus de la influenza B: el virus de la influenza B no replica el ARN 244 DI de la influenza A

No se sabe que los virus de influenza tipo A y tipo B interactúen genéticamente, aunque ambos tienen genomas compuestos por 8 segmentos. Los diferentes virus de influenza A experimentan redistribución genética de sus segmentos de ARN y del mismo modo los diferentes virus de influenza B experimentan recombinación genética de sus segmentos de ARN. La única sugerencia de cualquier interacción proviene de un experimento *in vitro* en el que la influenza A replicó un gen HA de influenza B conectado a un informador CAT [Jackson, D., A. Cadman, T. Zurcher y W. Barclay, A reverse genetics approach for recovery of recombinant influenza B viruses entirely from cDNA. Journal of Virology, 2002. 76: págs. 11744-11747.1]. Sin embargo, los autores de la presente invención no son conscientes de la capacidad de un virus de influenza B infeccioso para replicar ARN de interferencia defectuoso (DI) de influenza A *in vivo* o *viceversa*.

Con el fin de determinar si el virus de influenza B infeccioso replica ARN 244 DI presente en la influenza A 244/PR8 en huevos embrionados, se utilizó la RT-PCR para buscar un aumento en la cantidad de ARN 244. Se había demostrado previamente que el lote de 244/PR8 que se había examinado protegía a los ratones de la enfermedad causados por el virus de la influenza B/Lee.

El virus de influenza A 244/PR8 DI (Núm. 813) fue irradiado con UV durante 40 segundos para eliminar toda la infectividad. 244/PR8 es una preparación de virus purificado concentrado que tiene 2 x 10⁵ UHA/ml y aproximadamente 2 x 10¹² partículas físicas/ml. La influenza B/Lee/40 (Núm. 795) es fluido alantoideo y se utilizó a una alta dosis arbitraria de dilución 1/0 para asegurar la infección de todas las células, y para que la replicación del ARN de influenza A DI tuviera oportunidad de éxito. Se diluyó seriadamente 244/PR8 (véase la Tabla 7 a continuación) en 1/10 B/Lee que contenía penicilina y estreptomycin como medida de precaución contra la contaminación bacteriana de los huevos. Se inyectaron 100 µl de la mezcla y diversos controles en huevos de pollo embrionados de 10 días de edad (3 huevos/muestra) fueron inyectados con (Tabla 7).

Tabla 7. Esquema para la inoculación de huevos de pollo embrionados con mezclas de 244/PR8 DI de influenza A e influenza B infecciosa

	244/PR8	B/Lee*
A	1/10	+
B	1/100	+
C	1/000	+
D	1/10000	+
E	Ninguno	+
F	1/10	Ninguno
G	Ninguno	Ninguno

* Una dilución 1/10 del Núm. 795

Los huevos se incubaron a 33°C durante 24 h, se enfriaron y se recogieron los fluidos alantoideos. Se reunieron aproximadamente 2 ml de cada uno de 3 huevos y se almacenaron a -70°C. La cantidad de hemaglutinina viral (HA) en el líquido alantoideo se determinó mediante titulación del parámetro y la aglutinación de glóbulos rojos de pollo añadidos. La RT-PCR se llevó a cabo usando los cebadores terminales para el ARN de segmento 1 de PR8 del cual deriva el ARN 244.

5 La Tabla 8 (fila E) demuestra que B/Lee por sí mismo creció bien con un título de $10^{3,5}$ UHA/ml. 244/PR8 por sí mismo no tuvo título HA demostrando que era totalmente no infeccioso. Todas las mezclas de B/Lee y 244/PR8 (Tabla 8 filas A-D) proporcionaron aproximadamente el mismo título de HA demostrando que 244/PR8 no había interferido en la multiplicación de B/Lee.

Tabla 8. Producción de hemaglutinina por huevos inoculados con mezclas de 244/PR8 DI de influenza A e influenza B infecciosa*

	244/PR8	B/Lee**	UHA/ml (log ₁₀)
A	1/10	+	3,1
B	1/100	+	3,7
C	1/1000	+	3,3
D	1/10000	+	3,25
E	Ninguno	+	3,5
F	1/10	Ninguno	≤ 1,6
G	Ninguno	Ninguno	≤ 1,6

* Después de la incubación durante 24 horas a 33°C

** Una dilución 1/10 del Núm. 795
UHA, unidades de hemaglutinación

10 Se extrajo ARN de fluido alantoideo y se sometió a RT-PCR con los cebadores terminales para segmento 1 del ARN de PR8. La Figura 1 muestra que los huevos inoculados con 1/10 244/PR8 sin B/Lee (Calle F) proporcionaron un amplicón del tamaño esperado para el ARN 244 y presumiblemente derivaba del ARN del inóculo residual. Esto no es sorprendente ya que se sabe que el ARN 244 permanece en los pulmones de los ratones inoculados por la ruta intranasal durante varias semanas (datos no publicados). El amplicón de 1/10 244/PR8 mezclado con B/Lee (Calle A) no fue mayor que el derivado del propio 244/PR8, demostrando que B/Lee no había replicado 244/ARN. La Calle B tiene una traza de ARN 244 en línea con lo esperado a partir de una dilución 1/100. Obsérvese que la Calle E que se había inoculado con B/Lee solo contenía un amplicón, presumiblemente el resultado de un cebado no específico; todos los demás huevos inoculados con B/Lee tienen ese amplicón, en confirmación de la presencia de ese virus.

20 Un experimento paralelo en el que se realizó un intento de replicar ARN 244 no infeccioso utilizando influenza A/mallard/England/7277/06 en lugar de B/Lee (datos no mostrados) dio como resultado el aumento de la cantidad de todos los amplicones de ARN 244 a diluciones de 1/10 a 1/10000 sobre la del propio ARN 244. Para esta RT-PCR se utilizó un cebador específica de empalme específico de ARN 244 para evitar la confusión con cualquier otro ARN DI del segmento 1 endógeno que pudiera haber estado presente o pudiera haber surgido *de novo*. Este experimento sirvió como control positivo.

25 En conclusión, la influenza B/Lee no replicó el ARN 244 presente en el virus de influenza A DI 244/PR8 en las condiciones diseñadas para facilitar tal evento. Por lo tanto no hubo evidencia de interacción genética de influenza B/Lee con virus de influenza A DI.

30 **Ejemplo 4 - Comparación de la enfermedad clínica inducida por PVM en ratones BALB/c y ratones C3H/He-mg con el fin de confirmar la idoneidad de los ratones C3H/He-mg para la experimentación con PVM**

35 En éste y los siguientes ejemplos, los experimentos se llevaron a cabo para evaluar el efecto del uso de virus de influenza A DI que contiene ARN de interferencia de virus de la influenza, sobre la infección en ratones causada por el virus de la neumonía de ratones (PVM). Dado que todo el trabajo previo con influenza A se había llevado a cabo con ratones C3H/He-mg, ésta fue la cepa de ratón preferida para su uso. Sin embargo, fue necesario primero determinar que PVM causó su patrón típico de enfermedad, observado en ratones Balb/c, en los ratones C3H/He-mg.

40 **Preparación de virus de influenza A DI**

45 Se preparó virus DI activo mediante 40 segundos de irradiación UV de una provisión de partida de virus de la influenza A DI. El virus DI inactivo se preparó mediante 8 minutos de irradiación UV de la misma provisión de partida de virus de la influenza. Las provisiones de partida se diluyeron cuando fue apropiado.

Tratamiento con virus de influenza A DI

Los ratones se anestesiaron ligeramente con éter. El virus DI fue introducido mediante inoculación intranasal bilateral con un total de 40 µl de inóculo. Los ratones se recuperaron muy rápidamente y se observaron para asegurarse de que no mostraban ningún signo adverso.

5 **Infección con el virus de la neumonía de ratones (PVM)**

10 Todos los experimentos utilizaron la misma provisión de partida de la cepa J3666 de PVM. Se ha demostrado que ésta es altamente patogénica. Primero se anestesiaron los ratones mediante inyección intraperitoneal de una mezcla de 9 mg/ml de cetamina y 2 mg/ml de xilazina en PBS. A continuación se inoculó en los animales un volumen total de 50 µl de virus (típicamente aproximadamente 500 ufp de virus de menos que se indique lo contrario) mediante inoculación intranasal. Todas las infecciones se llevaron a cabo en un cabina microbiológica de clase I. Se dejó que los ratones se recuperaran y se colocaron en un aislador.

15 **Seguimiento del proceso de la infección**

Los ratones se controlaron diariamente. Todos los grupos de ratones se pesaron y los ratones individuales se puntuaron para determinar la presencia de signos clínicos de infección. Cualquier ratón que mostrara los signos clínicos más severos fue sacrificado, de acuerdo con los requisitos de la licencia del Ministerio del Interior bajo la cual se llevó a cabo el trabajo. La descripción de los signos clínicos para la infección por PVM se muestra en la siguiente Tabla 9. La Tabla 9 identifica los síntomas de la enfermedad en ratones infectados con cepas patogénicas del virus de la neumonía de ratones. En algunas cepas el progreso de la enfermedad es más rápido y algunos de los síntomas no se pueden observar fácilmente, p. ej., la cianosis de las orejas y la cola se observan fácilmente en las cepas albinas pero no en las cepas de ratones de color oscuro. El tiempo entre el nivel 2 y 4 puede ser corto y con frecuencia los niveles 2 y 3 no puede ser distinguidos como completamente separados.

25 **Tabla 9.** Descripción de los signos clínicos para la infección por PVM en ratones.

<u>Puntuación</u>	<u>Síntomas</u>
1	Sano, sin ningún signo de la enfermedad
2	Piel rizada, sobre todo en la parte posterior del cuello
3	Piloerección. Posiblemente respiración más profunda. Menos alerta
4	Evidente pérdida de peso. Dificultad respiratoria. Posibles temblores
5	Forma de andar anormal y dificultad para caminar. Dificultad respiratoria.
	Frecuentemente desnutrido. Puede presentar cianosis de colas y/u orejas
6	Muerto

El experimento del Ejemplo 4 se llevó a cabo con el fin de establecer el efecto de la infección por PVM en ratones C3H/He-mg.

30 Aunque los experimentos iniciales que describen el aislamiento de PVM utilizaron una línea exogámica, todos los trabajos publicados en los últimos 20 años han utilizado cepas endogámicas de ratones. El patrón de enfermedad se publicó primero utilizando ratones BALB/c y, posteriormente, se ha confirmado que los síntomas son idénticos en ratones C57/BL6. No se han publicado descripciones de la infección por PVM en ratones C3H/He-mg. Para permitir la comparación con el trabajo de protección contra virus de influenza que se llevó a cabo utilizando ratones C3H/He-mg éstos se sometieron a ensayo para determinar su respuesta a la infección por PVM. Se utilizaron ratones BALB/c como patrón para la comparación.

40 Se utilizaron cinco grupos, cada uno consistente en 4 ratones, ya fueran ratones BALB/c o C3H/He-mg. Se utilizó una provisión de partida de la cepa J3666 de PVM a cuatro diluciones, pura (aproximadamente 5.000 ufp en 50 µl) 1/3 (aproximadamente 1.700 ufp en 50 µl), 1/10 (aproximadamente 500 ufp en 50 µl) y 1/30 (aproximadamente 170 ufp en 50 µl). Se inocularon 50 µl de la dilución apropiada de virus a cada grupo de cuatro ratones y se inocularon 50 µl de PBS estéril como control a un grupo de control. Los grupos de ratones se pesaron cada día y se observaron en busca de signos clínicos de infección.

45 Los resultados se muestran en la Figura 2A y la Figura 2B. En este y en todos los experimentos con PVM posteriores los pesos de los grupos de animales se trazan tomando el peso inicial como 100%. Cada peso tomado después de esto se presenta como relativo al valor inicial. El peso de un ratón muerto se toma como 0 g. De este modo, si un grupo comenzó con 5 ratones con un peso total de 100 g (todos pesan 20 g) y un ratón murió pero los otros ratones se mantuvieron con el mismo peso, el peso del grupo sería de 80 g y por lo tanto con 80% del original. Cuando mueren todos los ratones el peso total es de 0 g y por lo tanto con 0% del original. El efecto de la infección

por PVM en ratones C3H/He-mg es el mismo que en los ratones BALB/c. Todos los experimentos posteriores con el virus de influenza A DI utilizaron ratones C3H/He-mg.

Ejemplo 5 - Determinación del efecto protector del virus de influenza A DI 244/PR8 contra la sensibilización con PVM - I

Este experimento pretendía investigar la capacidad protectora potencial del Virus de influenza A DI 244/PR8 contra una sensibilización con PVM en ratones C3H/He-mg.

El Ejemplo 4 confirmó que la infección con PVM en ratones C3H/He-mg seguía el mismo patrón de progreso de la enfermedad que se había establecido anteriormente en ratones BALB/c. En este experimento se utilizó la dosis más alta del virus de influenza A DI posible para que hubiera la más alta probabilidad de observar un efecto. A estos niveles elevados el virus de influenza A DI inactivo había mostrado cierta eficacia contra el virus de la influenza A infeccioso.

La provisión de partida de virus de influenza S DI 244/PR8 Núm. 812 (244/PR8) se preparó como se ha descrito anteriormente. Éste era material no diluido, es decir 12 µg/ratón, y 10 veces más que en los ensayos "convencionales" con una sensibilización con virus de influenza A. A los ratones se les administró o bien virus de influenza A DI activo o bien virus de influenza A DI inactivo utilizando el procedimiento convencional descrito anteriormente. A continuación los ratones fueron sensibilizados con PVM 24 horas más tarde. La cepa J3666 PVM se utilizó a dilución 1/3 (aproximadamente 1700 ufp en 50 µl).

Los tratamientos fueron:

1. virus de influenza A DI activo + PVM - 5 ratones
2. virus de influenza A DI inactivo + PVM - 5 ratones
3. inoculación simulada + PVM (es decir, sin virus de influenza A DI en la inoculación inicial) - 4 ratones
4. virus de influenza A DI activo y sin sensibilización (es decir, virus de influenza A DI + simulación) - 2 ratones
5. inoculación simulada, sin sensibilización (es decir, sin virus de influenza A DI en la inoculación inicial) - 3 ratones

Los pesos de los grupos de animales se representaron gráficamente tomando el peso un día después de la infección con PVM como 100%, como se muestra en la Figura 3.

El control (simulación + PVM) demuestra que el PVM era totalmente infeccioso. El tratamiento con el virus de la influenza A DI activo eliminó los signos de la infección con PVM, aunque hubo una pequeña disminución en el peso de este grupo los días 7-10. Los ratones tratados con virus de influenza A DI inactivo y, posteriormente, sensibilizados con PVM mostraron signos clínicos modestos los días 8 y 9 y una pérdida de peso significativa a partir del día 8 en adelante, aunque hubo un aumento de peso hacia el final del experimento. Los dos grupos de control restantes se comportaron como se esperaba.

La observación de la protección contra el sensibilización con PVM fue sorprendente. La protección menos eficaz con virus de influenza A DI inactivo sugirió que, o bien no había un efecto específico debido a la "carga" de partículas de virus utilizada en el inóculo o bien la alta concentración de virus de influenza A DI utilizada estaba confiriendo protección por una ruta no específica.

Ejemplo 6 - Determinación del efecto protector del Virus de influenza A DI 244/PR8 contra el sensibilización con PVM - II

El Ejemplo 5 sugirió que el Virus de influenza A DI puede ser capaz de conferir protección contra la sensibilización con PVM pero que ésta puede ser no específica. Los datos de este experimento se obtuvieron utilizando un inóculo de virus de influenza A DI 10 veces mayor que el utilizado en experimentos de sensibilización con virus de influenza. Para llevar a cabo una comparación más adecuada, el experimento se repitió utilizando el nivel convencional de inóculo de virus de influenza A DI (1,2 µg/ratón). Por tanto, este experimento repite el Ejemplo 5, pero utiliza una dosis 10 veces menor de virus de influenza A DI.

Los ratones fueron inoculados con virus de influenza A DI 244/PR8 preparado y liberado usando la técnica convencional descrita anteriormente. Después de 24 horas los ratones fueron sensibilizados con la cepa J3666 de PVM utilizada a una dilución 1/5 (aproximadamente 1.000 ufp en 50 µl).

Los grupos experimentales fueron:

1. virus de influenza A DI activo + PVM - 5 ratones
2. virus de influenza A DI inactivo + PVM - 5 ratones

3. inoculación simulada + PVM (es decir, sin virus de influenza A DI en la inoculación inicial) - 4 ratones
4. virus de influenza A DI activo y sin sensibilización (es decir, virus de influenza A DI + simulación) - 2 ratones
5. inoculación simulada, sin sensibilización (es decir, sin virus de influenza A DI en la inoculación inicial) - 2 ratones

5 La Figura 4 muestra los pesos de los grupos de animales trazados tomando el peso un día después de la infección con PVM como 100%. El virus de influenza A DI activo confirió una protección completa contra la presentación de los signos clínicos después de la infección con PVM en todos los animales. Hubo una pequeña reducción en el peso los días 8 y 9 en este grupo. El virus de la influenza A DI inactivo no mostró protección sucumbiendo todos los ratones a la infección, aunque puede haber un retraso muy pequeño en el progreso de la enfermedad en este grupo cuando se compara con el control que no recibió inoculación virus de influenza A DI.

15 Estos datos muestran una protección muy clara asociada a la inoculación con virus de influenza A DI activo y ninguna con virus de influenza A DI inactivo. Tomados en conjunto con los datos del Ejemplo 5, cuando se utilizó una dosis 10 veces más alta de virus de influenza A DI, esto sugiere que el virus de influenza A DI puede tener la capacidad de actuar a través de otro sistema. Esto sugeriría que a una concentración elevada las partículas de virus de la influenza pueden ser capaces de inducir otro sistema de defensa antiviral, pero que a dosis más bajas esta capacidad es mayor en las preparaciones de virus de influenza A DI activo en las preparaciones inactivadas.

20 **Ejemplo 7 - Investigación de la duración de la protección ejercida por el virus de la influenza A DI 244/PR8 contra la infección por PVM**

25 La protección conferida contra la infección con PVM por el virus de influenza A DI puede ser debida a uno o más factores. Este experimento se llevó a cabo para investigar la duración de la protección contra la infección con PVM conferida por el virus de la influenza A DI.

30 Los animales se trataron con Virus de influenza A DI 244/PR8 (activo o inactivo) de acuerdo con el procedimiento convencional descrito anteriormente en el Ejemplo 6. Todos los animales se observaron durante 6 días y luego se sensibilizaron con la cepa J3666 de PVM a una dilución 1/5 (aproximadamente 1.000 ufp en 50 µl). Los animales se observaron y cada grupo se pesó diariamente.

Los grupos experimentales fueron:

- 35 1. virus de influenza A DI activo + PVM - 5 ratones
2. virus de influenza A DI inactivo + PVM - 5 ratones
3. virus de influenza A DI activo y sin sensibilización (es decir, virus de influenza A DI + simulación) - 2 ratones
4. inoculación simulada, sin sensibilización (es decir, sin virus de influenza A DI en la inoculación inicial) - 1 ratón

40 La Figura 5 muestra un gráfico del transcurso del tiempo de los pesos de los grupos de animales. El peso de los animales un día después de la infección con PVM se tomó como 100%. Todos los ratones sensibilizados con PVM sucumbieron a la infección y se sacrificaron el día 7 de acuerdo con los requisitos de la licencia del Ministerio del Interior bajo la cual se llevó a cabo el trabajo.

45 La protección proporcionada por el virus de la influenza A DI activo se perdió en torno al día 7 después de la inoculación. Esto estaría de acuerdo con la posibilidad de que el virus de influenza A DI generara una respuesta de interferón de corta duración.

50 **Ejemplo 8 - Determinación de la relación entre la dosis de virus de la influenza A DI 244/PR8 y la protección contra la infección por PVM**

55 Los Ejemplos 5 y 6 sugieren que también puede haber una respuesta relacionada con la dosis para la protección conferida contra las infecciones por PVM. En este experimento se trató de determinar el nivel de virus de influenza A DI necesario para proporcionar protección contra la sensibilización con PVM. Se utilizaron tres diferentes niveles de virus de influenza A DI.

60 Se prepararon provisiones de partida de Virus de influenza A DI (244/PR8) y administraron a los ratones. A las 24 horas del tratamiento los ratones se sensibilizaron con la cepa J3666 de PVM a una dilución 1/5 (aproximadamente 1.000 ufp en 50 µl). Los animales se observaron y cada grupo se pesó diariamente.

Los grupos experimentales fueron:

1. Dilución 1/10 de virus de influenza A DI activo (1,2 µg/ratón) + sensibilización con PVM (Nota: esta es la dosis "convencional" de virus de influenza A DI utilizada en los experimentos anteriores) - 5 ratones.

2. Dilución 1/100 de virus de influenza A DI activo (120 ng/ratón) + sensibilización con PVM - 5 ratones.
3. Dilución 1/1000 de virus de influenza A DI activo (12 ng/ratón) + sensibilización con PVM - 5 ratones.
4. Dilución 1/10 de virus de influenza A DI inactivo (1,2 µg/ratón) + sensibilización con PVM - 5 ratones.
5. Dilución 1/10 de virus de influenza A DI activo (1,2 µg/ratón), sin sensibilización - 2 ratones.
6. Inoculación simulada, sin sensibilización - 2 ratones.

La Figura 6 muestra los pesos de los grupos de animales trazados a lo largo del tiempo tomando el peso un día después de la infección con PVM como 100%. Los datos muestran una clara respuesta dependiente de la dosis con clara protección a una dilución 1/10 (como se observa en otros experimentos), una protección parcial con la dilución 1/100 y, esencialmente, ninguna protección a la dilución de 1/1000. Es notable la ligera caída en el peso de los ratones tratados con la dilución 1/10, que es exactamente como la observada en los experimentos anteriores, a pesar de no estar presentes síntomas manifiestos externos.

Ejemplo 9 - Evaluación de la reproducibilidad de la protección ejercida por el virus de influenza A DI 244/PR8 contra la infección por PVM

Este experimento pretende repetir el Ejemplo 8 y demostrar la reproducibilidad.

La Figura 7 muestra los pesos de los grupos de animales que se representaron gráficamente a lo largo del tiempo tomando el peso un día después de la infección con PVM tomado 100%. Resulta evidente la respuesta a la dosis. En este experimento, la dilución 1/10 no protegió tan completamente como antes y hubo algunos signos clínicos menores de infección asociados con la pérdida de peso. Los signos clínicos estuvieron restringidos a un único ratón cada uno de los días 8, 10 y 12. Aquí la dilución 1/100 del virus de la influenza A DI mostró un buen grado de protección, pero la dilución 1/1000 no fue eficaz.

Ejemplo 10 - Determinación de la duración de la protección contra la infección por PVM proporcionada por el virus de la influenza A DI 244/PR8

Este experimento tiene por objeto definir adicionalmente la duración de la protección contra la infección por PVM proporcionada por el virus de la influenza A DI (véase el EJEMPLO 7).

Se utilizó la provisión de partida de virus de la influenza A DI 244/PR8 Núm. 813 y se diluyó 1/10 (1,2 µg/ratón).

Los grupos experimentales consistieron en:

1. virus de influenza A DI activo + PVM un día después del tratamiento - 5 ratones
2. virus de influenza A DI inactivo + PVM un día después del tratamiento - 5 ratones
3. virus de influenza A DI activo + PVM tres días después del tratamiento - 5 ratones
4. virus de influenza A DI inactivo + PVM tres días después del tratamiento - 5 ratones
5. virus de influenza A DI activo y sin sensibilización (es decir, virus de influenza A DI + simulación) - 2 ratones
6. inoculación simulada, sin sensibilización (es decir, sin virus de influenza A DI en la inoculación inicial) - 2 ratones

La Figura 8 muestra los pesos de los grupos de animales trazados a lo largo del tiempo tomando el peso el día del tratamiento con el virus de la influenza A DI como 100%. La protección con virus de influenza A DI activo cuando se sensibilizó al día 1 después del tratamiento no fue tan fuerte como se había observado anteriormente. Esto es probable que esto sea debido a que el nivel de dosificación es sub-óptimo.

A pesar de esto, se puede observar claramente que el efecto protector se pierde en torno al día 3 después del tratamiento 3.

Ejemplo 11 - Determinación de la actividad terapéutica del virus de la influenza A DI 244/PR8 contra la infección por PVM

Se ha demostrado que el virus de influenza A DI tienen actividad tanto profiláctica como terapéutica en las infecciones por virus de la influenza A. Una evaluación de la capacidad terapéutica de las infecciones por PVM puede dar un poco de información sobre el mecanismo de acción del virus de influenza A DI, así como de su valor potencial para el tratamiento de infecciones cursadas por neumovirus.

Se prepararon provisiones de partida de virus de influenza A DI 244/PR8 (1,2 µg/ratón) como se ha descrito anteriormente. Para los ratones que recibieron virus de influenza A DI el tratamiento se llevó a cabo como un primer procedimiento. A continuación, se realizaron las subsiguientes inoculaciones. Los ratones se sensibilizaron con la cepa J3666 de PVM a una dilución 1/5 (aproximadamente 1.000 ufp en 50 µl). Los animales se observaron y cada grupo se pesó diariamente.

Los grupos experimentales fueron:

1. Infección por PVM seguida de virus de influenza A DI activo un día después de la infección - 5 ratones
2. Infección por PVM seguido de virus de influenza A DI inactivo un día después de la infección - 5 ratones
3. virus de influenza A DI activo + PVM un día después del tratamiento - 5 ratones
4. virus de influenza A DI inactivo + PVM un día después del tratamiento - 5 ratones
5. virus de influenza A DI activo y sin sensibilización (es decir, virus de influenza A DI + simulación) - 2 ratones
6. inoculación simulada, sin sensibilización - 2 ratones

La Figura 9 muestra los pesos de los grupos de animales trazados a lo largo del tiempo tomando el peso el día del primer tratamiento (inoculación con virus de influenza A DI o infección con PVM) como 100%. Los datos confirman la protección frente a la infección cuando se utiliza virus de influenza A DI activo inoculado 24 horas antes de la infección con PVM. Como antes, existe una pequeña reducción en el peso del grupo que en este caso se asoció con la aparición de los síntomas más leves en un ratón, sin síntomas en los otros.

Al igual que antes, el tratamiento con virus de influenza A DI inactivo no proporcionó protección. El tratamiento con virus de influenza A DI activo 24 horas después de la infección con PVM no confirió una protección completa, pero alivió la enfermedad en comparación con los controles. Sorprendentemente, el tratamiento con virus de influenza A DI inactivo mostró un efecto marginal (un ratón superviviente que habían demostrado previamente síntomas de la enfermedad). Los datos son evidencia de un grado de eficacia terapéutica en las condiciones utilizadas.

Ejemplo 12 - Demostración de que el interferón de tipo I se encuentra en el pulmón, pero no en el suero de ratones inoculados por la ruta intranasal con el virus de la influenza A DI 244/PR8

Se inocularon ratones C3H/He-mg (16-20 g y aproximadamente 5 semanas de edad) por la ruta intranasal con anestesia ligera con virus de influenza A DI 244/PR8 (Núm. 812) o virus de influenza A DI inactivado por UV (i) o con diluyente - utilizando el procedimiento descrito anteriormente para los experimentos de protección. En experimentos separados ratones se inocularon con 12 o 1,2 µg de virus DI por ratón. Se utilizaron dos ratones por grupo. El virus DI no es infeccioso y no se utilizó ningún otro virus infeccioso. Los ratones se sacrificaron y se extrajeron los pulmones el 1 día después de la inoculación y se congelaron a -70°C. También se tomó sangre del corazón, y se procesó para separar el suero que se almacenó de la misma manera. Los pulmones de cada ratón se almacenaron por separado. Los sueros de los dos ratones se agruparon.

Un bioanálisis utilizó células L de ratón y el virus del Bosque de Semliki (SFV) cuya multiplicación es sensible al interferón en una placa de plástico de 96 pocillos. El interferón inhibe la citopatología causada por el SFV. La dosis mínima de SFV que destruiría de manera fiable las células en 5-6 días se determinó empíricamente.

Los pulmones de un ratón se descongelaron y se trituraron con arena, con una mano de mortero y mortero, en 1 ml de PBS que contenía albúmina de suero bovino al 0,1%. Después de la centrifugación a baja velocidad para eliminar la arena y la suciedad, se tomaron alícuotas del sobrenadante y se volvieron a congelar para el análisis de interferón. Debido a que los extractos de pulmón eran tóxicos para las células, el análisis comenzó a una dilución de 1/5, pero todavía se observó cierta toxicidad a esta dilución. Los resultados de las muestras tóxicas se ignoraron. Los sueros fueron menos tóxicos, pero como hubo menos material disponible las diluciones comenzaron normalmente a 1/5.

Para este análisis, el interferón (sobrenadante de pulmón o el suero) se diluyó seriadamente y se añadió a las células 1 día antes de que las células fueran infectadas para dejar tiempo para la inducción del estado antiviral. El medio se retiró al día siguiente y se reemplazó por el SFV y se incubó durante 5-6 días. Las células restantes se tiñeron a continuación con el colorante vital rojo neutro. El colorante se extrajo después en condiciones alcalinas que mejoran el color, y se cuantificó utilizando un lector de ELISA.

Además, cada placa contenía un control de virus, un control celular y un control de interferón positivo - un interferón beta de ratón recombinante de origen comercial (PBL Biomedical Laboratories).

La Figura 10 y la Tabla 10 demuestran que los pulmones de los ratones inoculados con virus de influenza A DI 244/PR8 puro eran positivos para el interferón hasta una dilución 1/40. Se observa cierta toxicidad con la muestra de pulmón más concentrada (1/5), pero la dilución 1/10 protegió 84,4% de las células, 6-veces más células supervivientes que en el control de virus sin interferón añadido. En contraste el suero del mismo ratón no mostró evidencia de actividad de interferón. En los ratones inoculados con Virus de influenza A DI 1/10 no se detectó interferón con una dilución de extracto de pulmón 1/10 o con suero 1/5 (Tabla 11). La titulación del patrón de interferón beta procedente de la placa utilizada para Figura 10/Tabla 10 se muestra en la Figura 11.

Tabla 10. Análisis para determinar el interferón en pulmón y suero 1 día después de la inoculación de los ratones con virus de la influenza A DI puro

	Pulmones/suero	Pulmones		Suero	
Inóculo ratón	Dilución analizada	DO con virus:DO sin virus (%)	Inhibición relativa de e.c.p.*	DO con virus:DO sin virus (%)	Inhibición relativa de e.c.p.*
DI 1/1	1/5	Tóxico	Na	18,3	1,3
	1/10	84,4	6,0	13,5	1,0
	1/20	47,4	3,4	10,8	0,8
	1/40	26,6	1,9	8,8	0,6
Ninguno	Na	14,2	1,0		1,0

DI, virus de influenza A DI
 * Inhibición relativa de e.c.p., DO virus : DO sin virus (%) para los pocillos con supuesto virus de interferón añadido/DO virus : DO sin virus para los pocillos sin interferón añadido de la columna 3.
 Na, no aplicable.
 Tóxico, toxicidad 18,5% con esta muestra de pulmón

5 **Tabla 11.** Análisis para determinar el interferón en pulmón y suero 1 día después de la inoculación de los ratones con virus de la influenza A DI 1/10

	Pulmones/suero	Pulmones		Suero	
Inóculo ratón	Dilución analizada	DO con virus : DO sin virus (%)	Inhibición relativa de e.c.p.*	DO con virus : DO sin virus (%)	Inhibición relativa de e.c.p.*
DI 1/10	1/5	Tóxico	Na	13,0	0,6
	1/10	20,9	0,9	10,0	0,4
	1/20	18,9	0,8	11,6	0,5
	1/40	15,2	0,7	11,2	0,5
Ninguno	Na	22,4	1,0		1,0

DI, virus de influenza A DI
 * Inhibición relativa de e.c.p., DO virus: DO sin virus (%) para los pocillos con supuesto interferón añadido/DO virus: DO sin virus para los pocillos sin interferón añadido de la columna 3.
 Na, no aplicable.
 Tóxico, toxicidad 46% con esta muestra de pulmón

El virus de influenza A DI inactivado no estimuló el interferón a una dilución en pulmón de 1/10 o una dilución de suero de 1/5 (véanse las Tablas 12 y 13 de más abajo).

10 **Tabla 12.** Ensayo de interferón en el pulmón y en el suero en 1 día después de la inoculación de ratones con aseado inactivada virus de influenza A DI

	Pulmones/suero	Pulmones		Suero	
Inóculo ratón	Dilución analizada	DO con virus: DO sin virus (%)	Inhibición relativa de e.c.p.*	DO con virus: DO sin virus (%)	Inhibición relativa de e.c.p.*
iDI 1/1	1/5	Tóxico	Na	13,3	0,5
	1/10	37,5	1,4	16,2	0,6
	1/20	22,1	0,8	15,8	0,6
	1/40	16,4	0,6	18,3	0,7
Ninguno	Na	27,2	1,0		1,0

	Pulmones/suero	Pulmones		Suero	
Inóculo ratón	Dilución analizada	DO con virus: DO sin virus (%)	Inhibición relativa de e.c.p.*	DO con virus: DO sin virus (%)	Inhibición relativa de e.c.p.*
iDI, virus de influenza A DI inactivado * Inhibición relativa de e.c.p., DO virus: DO sin virus (%) para los pocillos con supuesto interferón añadido/DO virus: DO sin virus para los pocillos sin interferón añadido de la columna 3. Na, no aplicable. Tóxico, toxicidad 65% con esta muestra de pulmón					

Tabla 13. Análisis para determinar el interferón en pulmón y suero 1 día después de la inoculación de ratones con virus de influenza A DI inactivado puro de un segundo ratón

	Pulmones/suero	Pulmones		Suero	
Inóculo ratón	Dilución analizada	DO con virus: DO sin virus (%)	Inhibición relativa de e.c.p.*	DO con virus: DO sin virus (%)	Inhibición relativa de e.c.p.*
iDI 1/1	1/5	Tóxico	Na	No realizado	
	1/10	Tóxico	Na		
	1/20	11,4	1,15		
	1/40	9,6	1,0		
Ninguno	Na	9,9	1,0		
iDI, virus de influenza A DI inactivado * Inhibición relativa de e.c.p., DO virus: DO sin virus (%) para los pocillos con supuesto interferón añadido/DO virus: DO sin virus para los pocillos sin interferón añadido de la columna 3. Na, no aplicable. Tóxico, toxicidad 34% con las muestras 1/5 y 1/10 de pulmón					

5 Se detectó supuesto interferón (estrictamente una entidad inhibidora de virus soluble no identificada) en los pulmones de los ratones después de la inoculación intranasal de virus de influenza A DI puro, pero no en el suero del mismo ratón. Se observó una inhibición de aproximadamente 50% a una dilución 1/20 de extracto de pulmón. No se identificó interferón en los pulmones o el suero de los ratones inoculados con virus de influenza A DI 1/10, o con

10 **Ejemplo 13 - Demostración de que el interferón de tipo I inducido en ratones inoculados por la ruta intranasal con virus de influenza A DI 244/PR8 se puede detectar en los pulmones durante 2 días**

15 Se inoculó virus de influenza A DI puro (12 µg/ratón) en ratones C3H/He-mg como se ha descrito para el Ejemplo 12 excepto que los pulmones se extrajeron 1, 2 y 4 días después de la inoculación.

El bioanálisis de interferón utilizado fue como el descrito para el Ejemplo 12.

20 La Tabla 14 muestra una fuerte actividad antiviral en los extractos de pulmón tomados los días 1 y 2, pero no el día 4 ($\leq 1/10$). El parámetro de 50% el día 1 fue $\geq 1/40$, y el día 2 fue de aproximadamente 1/30. No se encontró presente interferón en el suero (1/5) tomado el día 2 (datos no mostrados).

Tabla 14. Análisis para determinar el interferón en los pulmones de ratón los días 1, 2 y 4 después de la inoculación intranasal con virus de influenza A DI puro

		Día 1		Día 2		Día 4	
Inóculo ratón	Dilución analizada	DO con virus: DO sin virus (%)	Interferón presente	DO con virus: DO sin virus (%)	Interferón presente	DO con virus: DO sin virus (%)	Interferón presente
DI 1/1	1/5	Tóxico		Tóxico		Tóxico	
	1/10	72,8	+	91,9	+	8,1	-
	1/20	85,6	+	80,4	+	9,4	-

Inóculo ratón	Dilución analizada	Día 1		Día 2		Día 4	
		DO con virus: DO sin virus (%)	Interferón presente	DO con virus: DO sin virus (%)	Interferón presente	DO con virus: DO sin virus (%)	Interferón presente
	1/40	85,2	+	20,1	±	9,8	-
Ninguno	Na	7,2	Na	7,2	Na	8,8	Na
DI, virus de influenza A DI Tóxico, cierta toxicidad Na, no aplicable							

5 El interferón estaba presente en los pulmones los días 1 y 2 después de la inoculación, pero no se detectó 4 días después de la inoculación, lo que sugiere que el interferón inducido tiene una vida media relativamente corta en esa ubicación. Téngase en cuenta que en este experimento no se aborda la cuestión de la duración del estado antiviral inducido por interferón en los pulmones

Ejemplo 14 - Demostración de que el interferón de tipo I no es inducido en los pulmones o el suero de ratones inoculados por la ruta intranasal con los virus de influenza A DI 220/Vic o 220/PR8

10 Se utilizaron ratones C3H/He-mg como se ha descrito para el Ejemplo 12, excepto que se inocularon (12 µg/ratón) de virus 220/PR8 (Núm. 794) o 220/Vic (Núm. 798) puros o DI inactivados con UV (i).

El bioanálisis de interferón utilizado fue como el descrito para el Ejemplo 12.

15 No se detectó interferón en los pulmones o el suero de los ratones inoculados con virus de influenza A DI 220/PR8 o 220/Vic puros o Virus de influenza A DI 220/PR8 o 220/Vic inactivados (Tablas 15, 16). No hubo problemas técnicos con el análisis y cada placa de microtitulación contenía una titulación patrón de interferón beta para asegurar que el análisis era competente - un ejemplo se muestra en la Figura 12. Hubo 2 ratones por grupo y no se detectó interferón en ninguno de ellos.

20 **Tabla 15.** Fracaso al detectar interferón en pulmones o suero de ratones después de la inoculación intranasal con virus de influenza A 220/PR8 DI puro - muestras tomadas 1 día después

Inóculo ratón	Dilución analizada	DI		iDI	
		Pulmones	Suero	Pulmones	Suero
		DO con virus: DO sin virus (%)	DO con virus: DO sin virus (%)	DO con virus: DO sin virus (%)	DO con virus: DO sin virus (%)
DI 1/1	1/5	8,0	Nr	Tóxico	Nr
	1/10	5,7	9,2	9,6	7,7
	1/20	5,3	7,9	5,4	7,2
	1/40	5,3	8,1	5,8	6,3
Ninguno	Na	9,7		8,0	
DI, virus de influenza A DI Tóxico, cierta toxicidad Na, no aplicable					

25 **Tabla 16.** Fracaso al detectar interferón en pulmones o suero de ratones después de la inoculación intranasal con virus de influenza virus de influenza A DI 220/Vic puro - muestras tomadas 1 día después.

Inóculo ratón	Dilución analizada	DI		iDI	
		Pulmones	Suero	Pulmones	Suero
		DO con virus: DO sin virus (%)	DO con virus: DO sin virus (%)	DO con virus: DO sin virus (%)	DO con virus: DO sin virus (%)

		DI		iDI	
		Pulmones	Suero	Pulmones	Suero
Inóculo ratón	Dilución analizada	DO con virus: DO sin virus (%)			
DI 1/1	1/5	Tóxico	Nr	13,1	Nr
	1/10	8,1	6,4	6,1	7,3
	1/20	7,5	6,8	7,1	7,0
	1/40	7,9	6,6	5,6	6,5
Ninguno	Na	7,8		8,0	
DI, virus de influenza A DI Tóxico, cierta toxicidad Na, no aplicable					

5 Los virus de influenza A DI 220/PR8 o 220/Vic inoculados por la ruta intranasal no estimularon ningún interferón detectable en los pulmones o el suero del ratón. Esto contrasta con la inducción de interferón en las células diseñadas para expresar luciferasa bajo el control de un promotor de interferón, donde 220/Vic estimuló el interferón a una dilución 1/00 y, posiblemente, una dilución 1/1000 pero 220/PR8 puro no estimuló el interferón (Ejemplo 17).

Ejemplo 15 - Demostración de que el interferón de tipo I se encuentra en el suero, pero no en los pulmones de ratones a los que se ha inyectado por vía intraperitoneal Virus de influenza A DI 244/PR8

10 Se utilizaron ratones C3H/He-mg como se ha descrito para el Ejemplo 12, excepto que a los ratones se les inyectó por vía intraperitoneal virus DI 244/PR8 (Núm. 812) o DI inactivado por UV (i), o diluyente. Cada ratón recibió 20 µl de DI/iDI elaborado hasta 100 µl, es decir, la misma dosis que se había administrado por la ruta intranasal (12 µg/ratón). Se utilizaron dos ratones por grupo.

15 El bioanálisis de interferón usado era como el descrito para el Ejemplo 12.

20 La Tabla 17 demuestra que el interferón era detectado reproduciblemente en el suero de los dos ratones a los que se había inyectados por vía intraperitoneal Virus de influenza A DI 1 día después de la inoculación. Una dilución de aproximadamente 1/120 protegió aproximadamente 50% de la monocapa de células. Se detectó poco interferón con el virus iDI excepto, posiblemente, a la dilución 1/10 de suero - 14,5% y 44,4% de inhibición en ratones de réplica (véase la Tabla 18). La concentración más alta de extracto de pulmón (1/10) inhibió el virus aproximadamente 3 veces en un ratón - el otro extracto fue citotóxico a esa concentración.

25 **Tabla 17.** Después de la inyección intraperitoneal en ratones con virus de influenza A DI 244/PR8 puro se encontró una fuerte respuesta de interferón en suero pero no en pulmones - las muestras se tomaron 1 día después de la inyección.

		Ratón 1		Ratón 2	
		Pulmones	Suero	Pulmones	Suero
Inóculo ratón	Dilución analizada	DO con virus: DO sin virus (%)			
DI 1/1	1/10	21,4	91,8	tóxico	Na
	1/20	5,8	89,3	7,1	95,1
	1/40	6,1	80,6	6,8	95,9
	1/80	Nr	85,2	Nr	66,6
	1/160	Nr	18,1	Nr	27,7
Ninguno	Na	7,2	Na	8,1	Na
DI, virus de influenza A DI Tóxico, cierta toxicidad					

		Ratón 1		Ratón 2	
		Pulmones	Suero	Pulmones	Suero
Inóculo ratón	Dilución analizada	DO con virus: DO sin virus (%)			
Na, no aplicable, Nr, no realizado					

Tabla 18. Después de la inyección intraperitoneal en ratones con virus 244/PR8 iDI puro no se encontró interferón en el suero ni en los pulmones - las muestras se tomaron como antes.

		Ratón Núm. 1		Ratón Núm. 2	
		Pulmones	Suero	Pulmones	Suero
Inóculo ratón	Dilución analizada	DO con virus: DO sin virus (%)			
DI 1/1	1/10	10,4	14,5	9,4	44,4
	1/20	8,4	8,1	6,8	8,5
	1/40	6,4	7,3	7,4	11,2
	1/80	Nr	7,8	Nr	10,3
	1/160	Nr	7,4	Nr	10,2
Ninguno	Na	9,8	Na	13,8	Na
DI, virus de influenza A DI Tóxico, cierta toxicidad Na, no aplicable, Nr, no realizado					

- 5 El 244/PR8 inyectado por vía intraperitoneal en ratones estimuló una fuerte respuesta de interferón en suero. El análisis de interferón proporcionó una inhibición significativa del virus a 1/160, con una inhibición de 50% a una dilución de aproximadamente 1/120 de suero. Hubo poco o ningún interferón en los pulmones - un ratón mostró un ligero efecto inhibidor del virus a una dilución 1/10. Esto contrasta con la inoculación intranasal de virus de DI donde interferón fue estimulado en los pulmones, pero no en el suero. Parece que hay más interferón estimulado por la ruta intraperitoneal que por inoculación intranasal del virus DI - el respectivo día 1 los títulos del 50% fueron de aproximadamente 1/120 y 1/20. Hay un factor de dilución inherente en la preparación del extracto de pulmón de aproximadamente 2 a 3 veces, pero esto no justifica la diferencia de interferón estimulado.

15 **Ejemplo 16 - Identificación formal de que la actividad inhibidora de virus que aparece en el suero después de la inyección intraperitoneal en ratones con virus de la influenza A DI 244/PR8 es interferón de tipo I**

20 Todos los interferones de tipo I (13 tipos de interferón alfa y 1 proteína interferón beta) utilizan el mismo receptor, que es una proteína transmembrana con una o varias regiones de unión a interferón en su dominio externo. De este modo, la actividad por cualquiera de ellos puede ser bloqueada por un anticuerpo para el dominio externo del receptor de interferón de tipo I. Tal anticuerpo, obtenido de R & D Systems Inc. (número de lote WXB01), fue producido en cabras mediante inmunización con el dominio extracelular del receptor interferón de tipo I α/β recombinante de ratón. La IgG se purificó mediante el uso de un receptor de interferón de tipo I α/β del ratón y cromatografía de afinidad en fase sólida. La fuente de interferón fue el interferón en suero inducido en el Experimento 4 mediante inyección intraperitoneal de virus de influenza A DI 244/PR8.

25 El bioanálisis de interferón convencional descrito anteriormente utilizó células L de ratón y virus del Bosque de Semliki (SFV) en una placa de plástico de 96 pocillos. La dosis mínima de SFV que podría separar de forma fiable las células del sustrato de plástico en 5-6 días se determinó empíricamente. El interferón inhibe la citopatología causada por SFV.

30 Se incubaron monocapas L de ratón con o sin anticuerpo (10 $\mu\text{g}/\text{pocillo}$) específico para receptor interferón de tipo I α/β de ratón recombinante durante 1 hora a 37°C. Esto se eliminó y se añadió el suero que contenía interferón (parámetro inhibidor de 50% de 1/120) a diluciones 1/20 y 1/40 y se incubó durante la noche para proporcionar el tiempo para la inducción del estado antiviral. El medio se retiró al día siguiente y se sustituyó por SFV. La incubación continuó a 37°C. Los pocillos se examinaron diariamente con el microscopio óptico para determinar los efectos citopáticos (e.c.p.) causados por el virus, y se puntuaron a los 3 días cuando el e.c.p. fue máximo.

Además, cada placa contenía un control de virus, el control de células y un control de interferón positivo - un interferón-beta de ratón recombinante de origen comercial (PBL Biomedical Laboratories).

- 5 La Tabla 19 (columnas 2 y 4) demuestran que el interferón en suero a diluciones tanto de 1/20 como de 1/40 inhibió completamente el extenso efecto citopático (e.c.p.) causado por el SFV. Sin embargo, cuando el anticuerpo para el receptor de interferón de tipo I α/β de ratón recombinante se añadió primero a las células (columnas 3 y 5), fue evidente un e.c.p. máximo que indicaba que el anticuerpo había inhibido la acción del interferón, y por lo tanto que el agente inhibidor del virus era de hecho un interferón de tipo I. La Tabla 20 demuestra la titulación esperada presente en la misma placa de 96 pocillos del interferón-beta de tipo I convencional de los autores de la presente invención.

Tabla 19. Inhibición de la actividad de interferón en suero de ratón mediante preincubación de las células L de ratón diana con anticuerpos contra el receptor de interferón α/β de ratón recombinante

	Ensayo para la actividad de interferón				Control de virus	Control de células
	-	+	-	+		
Anticuerpo contra el receptor de interferón de tipo I	-	+	-	+	-	-
Interferón (suero 1/20)	+	+	Na	Na	-	-
Interferón (suero 1/40)	Na	Na	+	+	-	-
SFV	+	+	+	+	+	-
e.c.p. en células L	-	++++	-	++++	++++	-

Na, no aplicable
 + + + + e.c.p. (efecto citopático), destrucción de $\geq 99\%$ de las monocapas de células por SFV (virus del Bosque de Semliki), - e.c.p., destrucción de ninguna de las monocapas de células; el e.c.p. se leyó diariamente y se registró 3 días después de la infección.

- 15 **Tabla 20.** Titulación de un patrón interferón beta de la misma placa que la Tabla 19

	Número de unidades de interferón/pocillo (\log_{10})										Control de virus	Control de células
	2,0	2,0	1,5	1,5	1,0	1,0	0,5	0,5	0	0		
Interferón	2,0	2,0	1,5	1,5	1,0	1,0	0,5	0,5	0	0	Ninguno	Ninguno
e.c.p.	++++	++++	++++	++++	++++	+	-	-	-	-	++++	-

+ + + + e.c.p., destrucción de 99% de las monocapas de células, - e.c.p., destrucción de ninguna de las monocapas de células

La actividad inhibidora de SFV presente en el suero de ratones a los que se había inyectado intraperitonealmente virus de influenza A DI 244/PR8 fue inhibida por un anticuerpo para el dominio externo del receptor de interferón de tipo I, que por lo tanto lo identifica de manera inequívoca como un interferón de tipo I.

- 20 **Ejemplo 17 - Demostración de que el interferón de tipo I es inducido en cultivo celular por los virus de influenza A DI**

25 Se utilizaron virus DI no infecciosos e inactivados con UV (iDI) (véase la siguiente Tabla 22). Todos contenían 2×10^5 unidades hemaglutinantes (UHA)/ml. Estos se inocularon a las diluciones indicadas (Tabla 22) en una línea de células de pulmón humano (A549) diseñada para expresar un gen de luciferasa activado por un promotor de interferón. El control positivo para la inducción de interferón fue el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) (véase la Tabla 21).

- 30 **Tabla 21.** Controles para la inducción de interferón en análisis repetidos

	Experimento 1	Experimento 2
Control negativo	0,17*	0,27
Control positivo (NDV)	25,15	105,9

* Niveles de luciferasa; NDV, virus de la enfermedad de Newcastle.

Tabla 22. Inducción de interferón por los virus de influenza DI

	Dilución	Experimento 1				Experimento 2	
		DI	DI*	iDI	iDI*	DI	iDI
244/PR8 Núm. 793	1/1	10,87**	45,76	0,26	1,1	5,27	
		8,66	36,56	0,26	1,1	4,83	
	1/10	1,39	5,85	0,23	1,0	Nr	
		1,76	7,41	0,23	1,0		
	1/100	0,63	2,65	Nr	Nr	Nr	
		0,51	2,15				
	1/1000	Nr				1,62	
						1,34	
220/Vic Núm. 792	1/1					34,07	0,44
						23,15	0,47
	1/10					14,37	0,49
						8,86	0,4
	1/100					2,88	Nr
						2,84	
	1/1000					0,65	
						2,84	
220/PR8 Núm. 794	1/1					0,39	1,34
						0,45	1,68
	1/10					0,45	0,23
						0,48	0,32
	1/100					0,41	Nr
						0,45	
	1/1000					0,4	Nr
						0,41	

* Los valores de luciferasa en la columna 4 y 6 se han normalizado para el valor de control de NDV positivo en el experimento 2 (105,9/25,25) (Tabla 1).
 ** niveles de luciferasa.
 Nr, no realizado

5 La Tabla 22, experimento 1 demuestra que el virus de influenza A DI 244/PR8 indujo interferón pero Virus de influenza A DI inactivado no (1,5 x control negativo). La inducción de interferón se tituló, y el interferón fue inducido por virus de influenza A DI 1/10. El valor para el virus de influenza A DI 1/100 probablemente no fue significativo (aunque la DO de control negativo fue 0,17, el valor 1/1000 para el Virus de influenza A DI 220/PR8 Núm. 794 fue 0,4)

10 Después de la normalización de acuerdo con el interferón inducido por los controles positivos NDV, la cantidad de interferón inducida por Virus de influenza A DI 244/PR8 en el experimento 1 fue muy similar a la estimulada por virus de influenza A DI 220/Vic Núm. 792 en el experimento 2, y ambas fueron superiores a la producida por el virus de influenza A DI 220/PR8 Núm. 794. De este modo la capacidad de inducir interferón es:
 244/PR8 = 220/Vic < 220/PRB.

15 El virus de influenza A DI 244/PR8 Núm. 793 indujo aproximadamente 2 veces menos interferón (o 9 veces por el valor normalizado) en el experimento 2 - posiblemente el resultado de la inactivación en el almacenamiento o la congelación-descongelación.

La diferencia entre los estimuladores de interferón (virus de influenza A DI 244/PR8, 220/Vic) y el no estimulador (220/PR8) es sorprendente, pero es difícil de entender que 220/Vic y 220/PR8 tienen el mismo ARN 220 DI clonado. Sin embargo, los altos niveles de interferón de 244/PR8 Núm. 793 y Núm. 220/Vic 792 se correlacionan bien con el grado de protección del ratón contra el virus de influenza B.

5 **Ejemplo 18 - Demostración de que el pretratamiento durante 24 horas de ratones con virus de influenza A DI aumenta la eficacia de la protección contra virus de influenza B en comparación con el tratamiento simultáneo**

10 Se administró intranasalmente virus de influenza A DI 244/PR8 clonado (1,2 y 0,12 µg/ratón) como se ha descrito anteriormente, a ratones ligeramente anestesiados ya sea 24 horas antes de la infección con influenza B/Lee/40 ya sea simultáneamente como una mezcla con B/Lee. Los efectos no específicos del virus DI fueron controlados inactivando el virus DI mediante 8 minutos de exposición a luz UV. Los ratones se pesaron diariamente y se evaluaron para determinar la enfermedad clínica. Los datos de la Tabla 23, fila 6 demuestran que los ratones a los que se administraron el virus DI activo y B/Lee simultáneamente, enfermaron todos y perdieron peso; a pesar de que fueron protegidos de una enfermedad más grave (como se indica por la mayor pérdida de peso) y muerte (fila 7). En comparación, el tratamiento previo con la misma cantidad de virus DI activo evitó cualquier pérdida de peso y casi toda la enfermedad clínica (fila 2). El tratamiento previo con el virus DI activo diluido 10 veces más (0,1 µg, fila 4) también proporcionó una cierta protección contra la enfermedad clínica, su gravedad y evitó todas las muertes.

20 **Tabla 23.** El pretratamiento de ratones con virus de influenza A DI aumenta la eficacia de la protección contra virus de influenza B

1	Virus DI	Sensibilización con virus simultánea	Sensibilización con virus después de 24 horas	Enfermedad clínica	Pérdida de peso (%)	Muerte
2	1,2 µg activo	-	+	1/5*	-3,7	0/5
3	1,2 µg inactivado	-	+	5/5	10,6	3/5
4	0,12 µg activo	-	+	4/5	5,8	0/5
5	0,12 µg inactivado	-	+	5/5	19,4	4/5
6	1,2 µg activo	+	-	5/5	9,2	0/5
7	1,2 µg inactivado	+	-	4/5	17,8	2/5
8	0	-	+	5/5	15,3	2/5

* 1 ratón estuvo enfermo durante 1 solo día.

25 A los ratones supervivientes en un experimento similar se les administró una dosis alta de sensibilización de B/Lee 3 semanas después de la infección, para someter a ensayo si esos ratones que no habían padecido ninguna enfermedad clínica manifiesta (véase la Tabla 23, fila 2) habían desarrollado una inmunidad convencional. Todos estuvieron completamente protegidos, lo que sugirió que efectivamente habían sido inmunizados por una infección silenciosa con B/Lee (datos no mostrados).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un virus de influenza A de interferencia defectuoso (DI), humano 244/PR8 clonado para su uso en la prevención o el tratamiento de una infección o enfermedad causadas por un virus distinto de influenza A, en donde que la infección o enfermedad es causada por un virus respiratorio.
2. El virus reivindicado en la reivindicación 1, en el que la infección o la enfermedad es causada por un virus de la familia *Paramyxoviridae*.
- 10 3. El virus reivindicado en la reivindicación 2, en donde la infección o la enfermedad están causadas por un *Pneumovirus*.
- 15 4. El virus reivindicado en la reivindicación 3, en donde la infección o la enfermedad están causadas por un virus sincitial respiratorio humano 10 (HRSV).
5. El virus reivindicado en la reivindicación 2, en donde la infección o la enfermedad están causadas por un *Metapneumovirus*, p. ej., metapneumovirus humano (hMPV).
- 20 6. El virus reivindicado en la reivindicación 1, en donde el virus es un virus de la familia *Orthomyxoviridae*.
7. El virus reivindicado en la reivindicación 6, en donde la infección o la enfermedad están causadas por un virus de influenza B o un virus de influenza C.
- 25 8. El virus reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el virus causante de la infección o enfermedad es un virus humano.
9. El virus reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el virus DI clonado es para su administración en la mucosa.
- 30 10. El virus reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el virus DI clonado no es un virus de ARN con una estructura de ARN de copia de respaldo "copyback" o de reversión "snapback".
- 35 11. Una composición para uso en la prevención o tratamiento de una infección viral en un individuo humano o animal, que comprende una cantidad inductora de interferón de influenza A de interferencia defectuoso (DI) humano 244/PR8 clonado, en donde la infección viral es por un virus respiratorio en donde dicho virus respiratorio no es de influenza A.
- 40 12. Una composición como se reivindica en la reivindicación 11, en donde la composición se formula para administración en la mucosa.
- 45 13. Una composición como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 11 a 12, en donde la infección viral se selecciona entre uno o más de:
 (a) un virus de *Paramyxoviridae*;
 (b) un *Pneumovirus*, p. ej., el virus respiratorio sincitial humano (HRSV);
 (c) un *Metapneumovirus* p. ej., metapneumovirus humano (HMPV);
 (d) un virus de *Orthomyxoviridae*, p. ej., un virus de influenza B o virus de influenza C.
- 50 14. Una composición como se reivindica en la reivindicación 13, en donde la infección viral está causada por el virus sincitial respiratorio humano (HRSV).
- 55 15. Una composición como se reivindica en la reivindicación 13, en donde la infección viral está causada por un virus de influenza B.

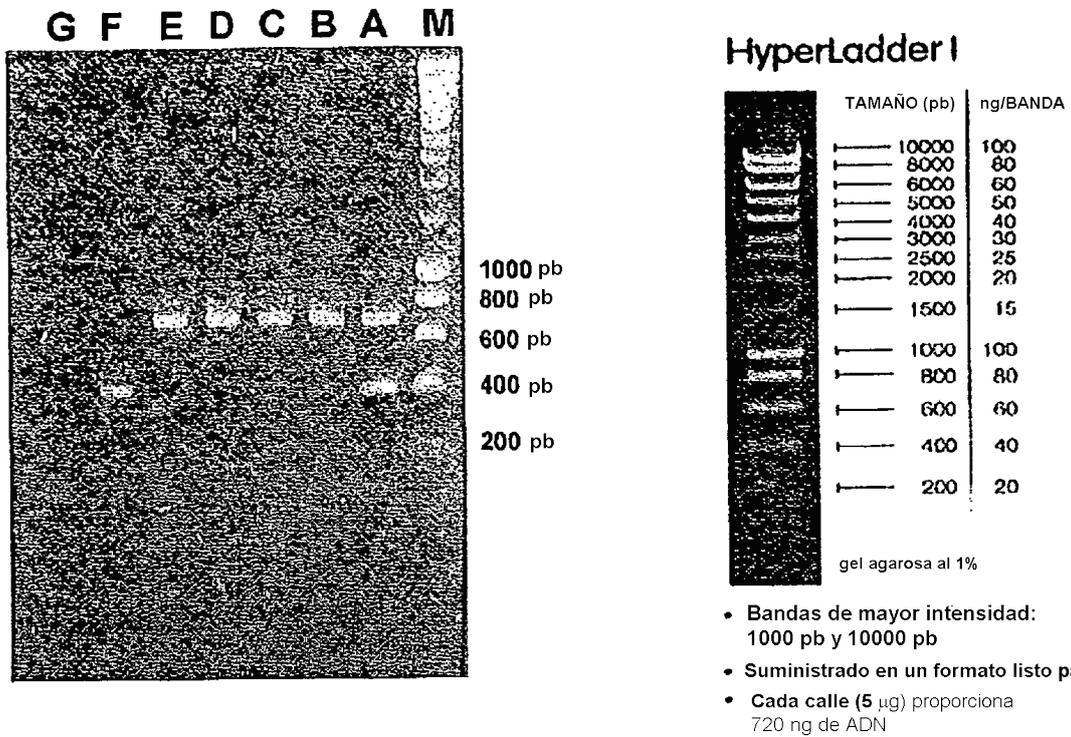


FIGURA 1

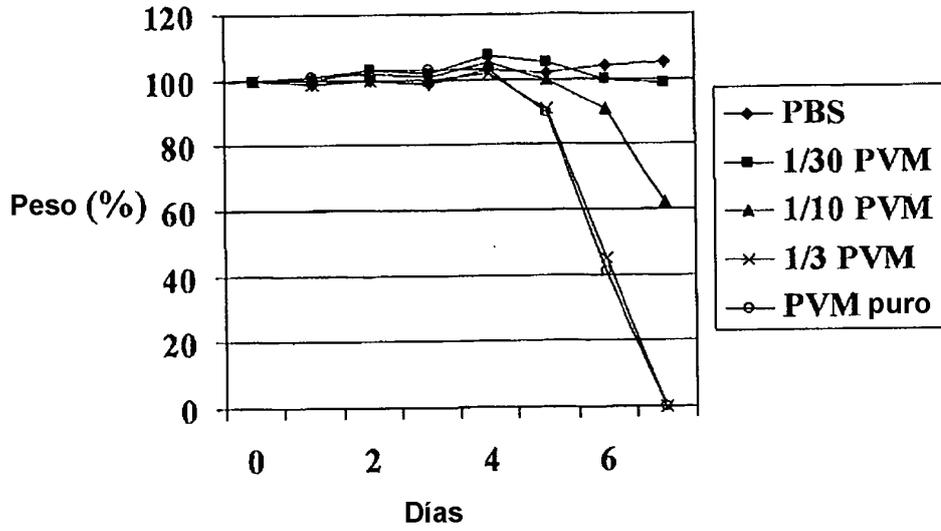


FIGURA 2A

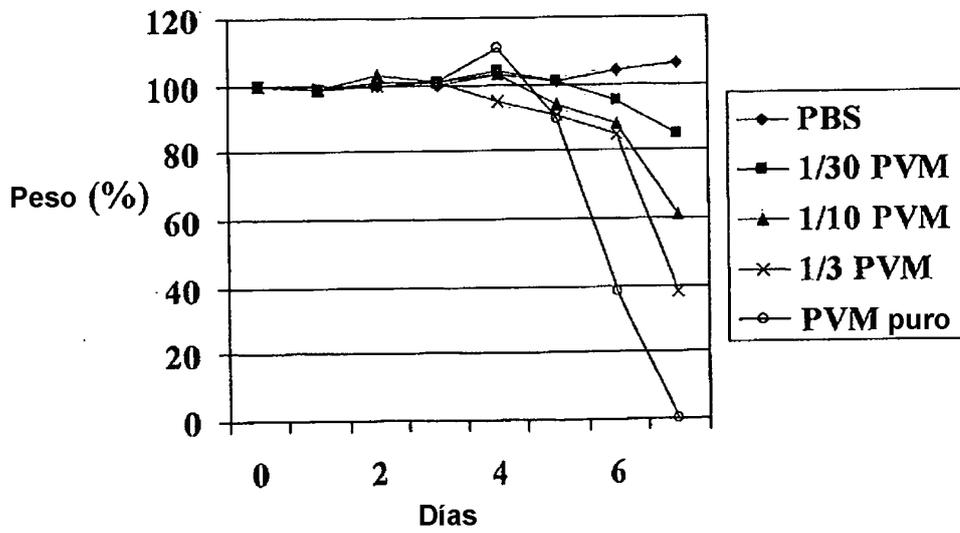


FIGURA 2B

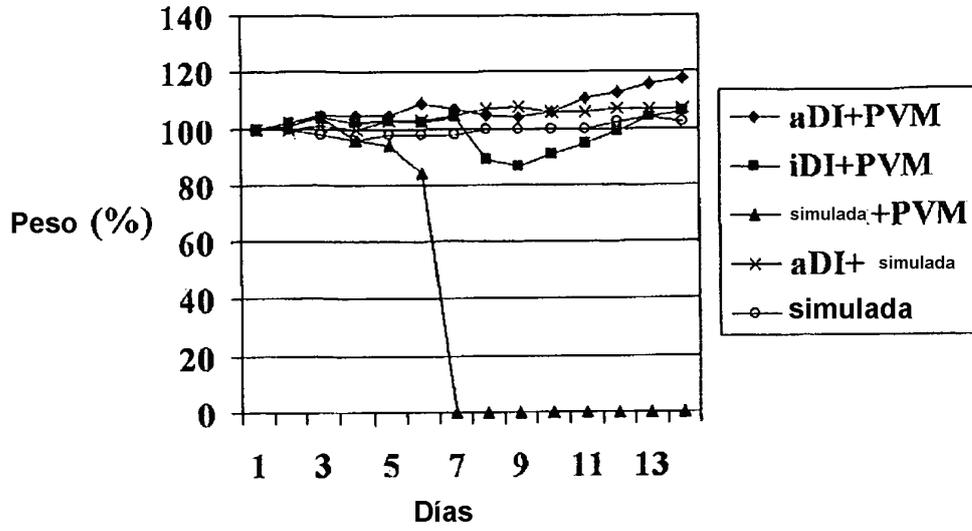


Figura 3

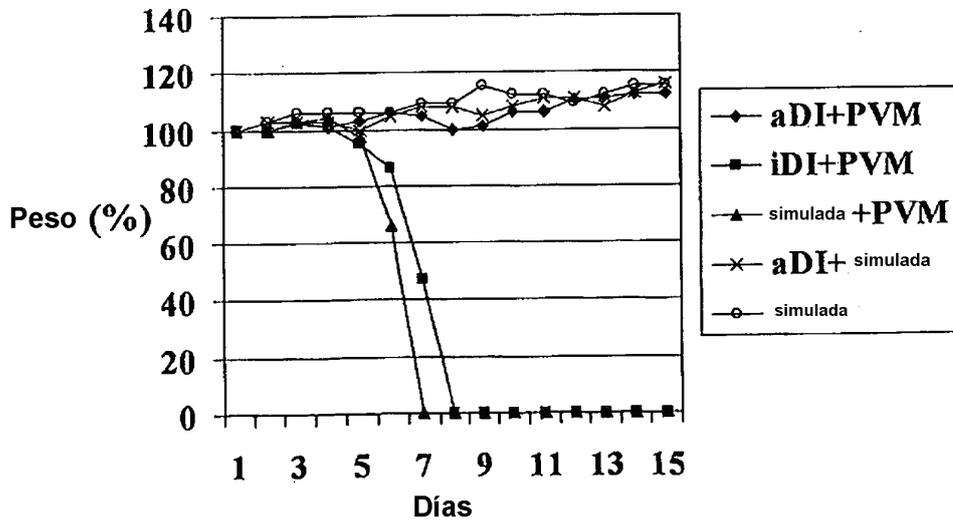


FIGURA 4

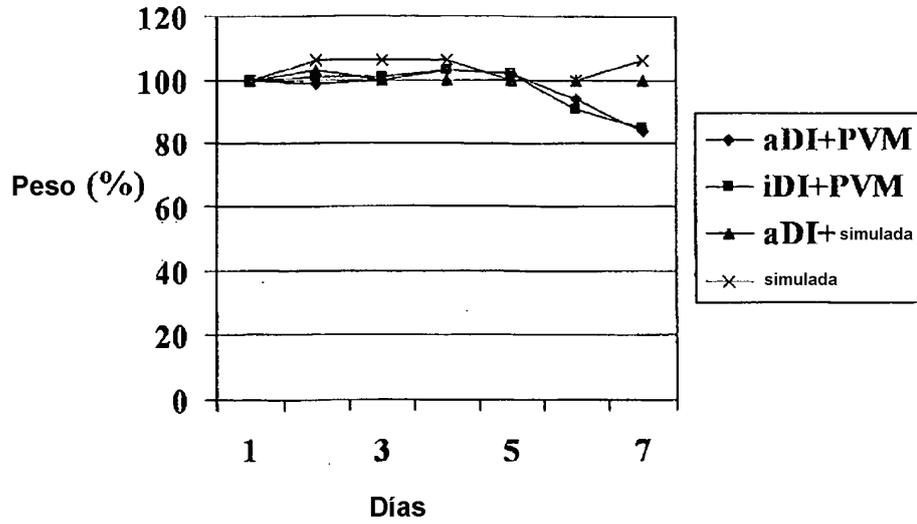


FIGURA 5

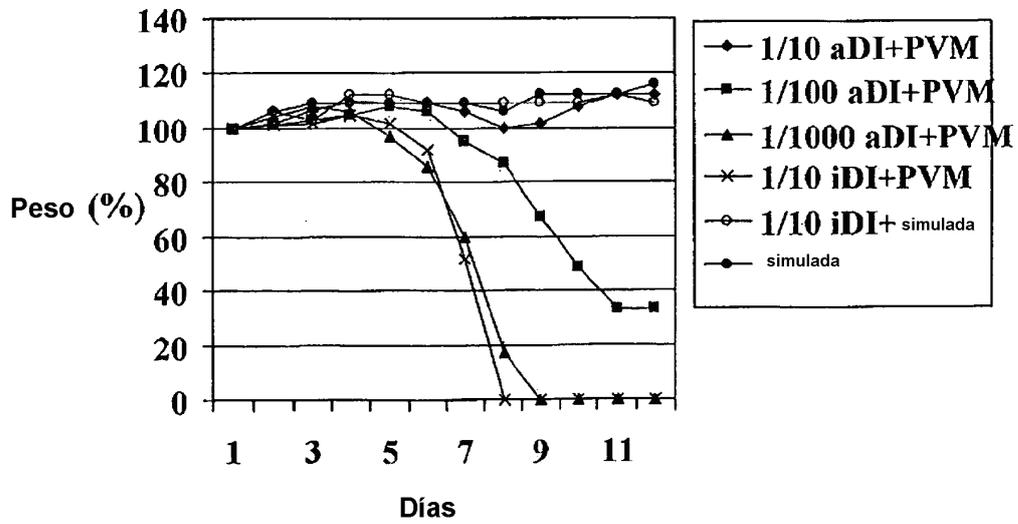


FIGURA 6

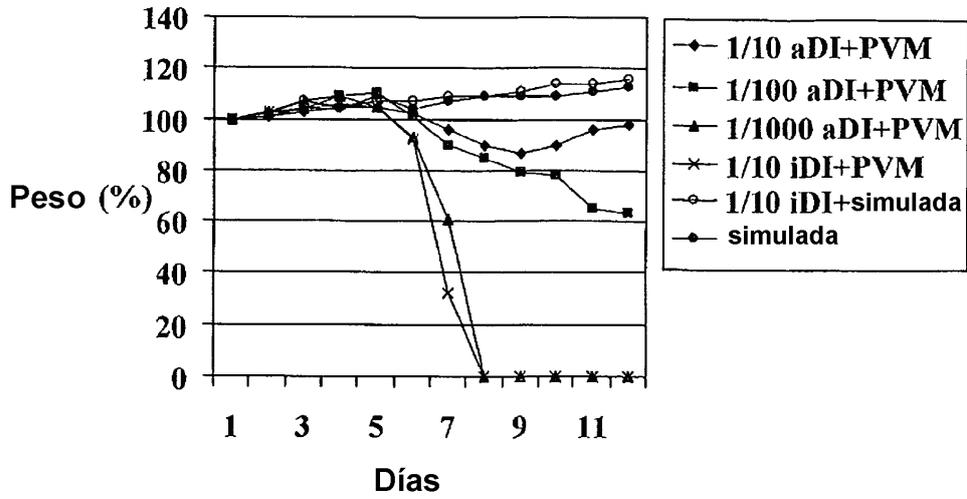


FIGURA 7

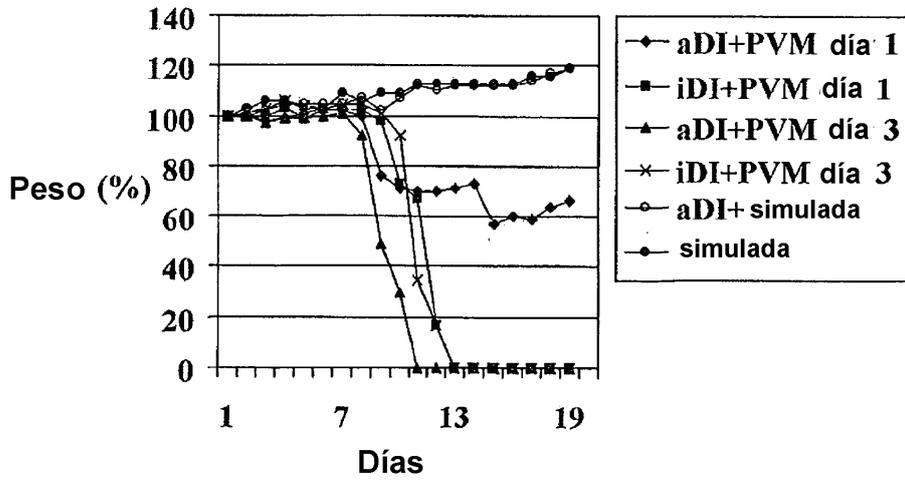


FIGURA 8

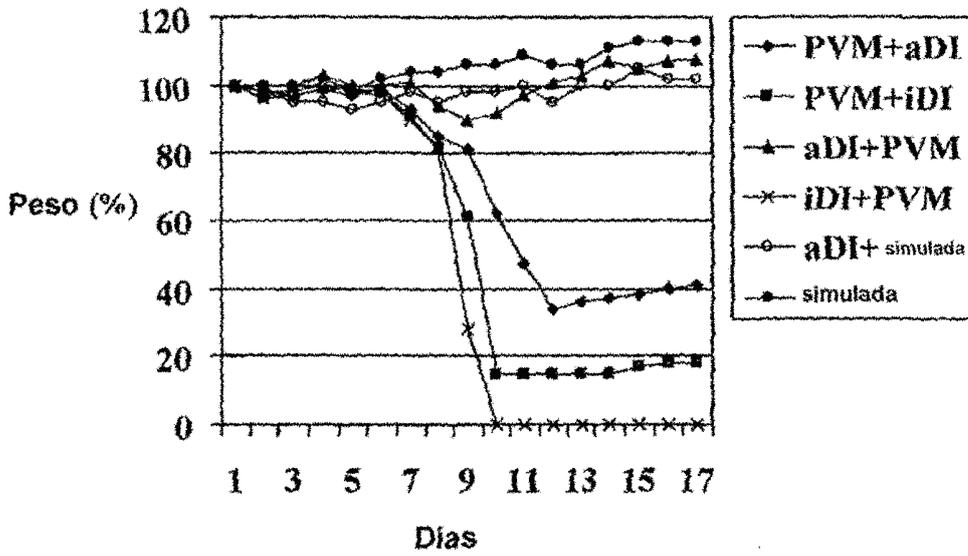


FIGURA 9

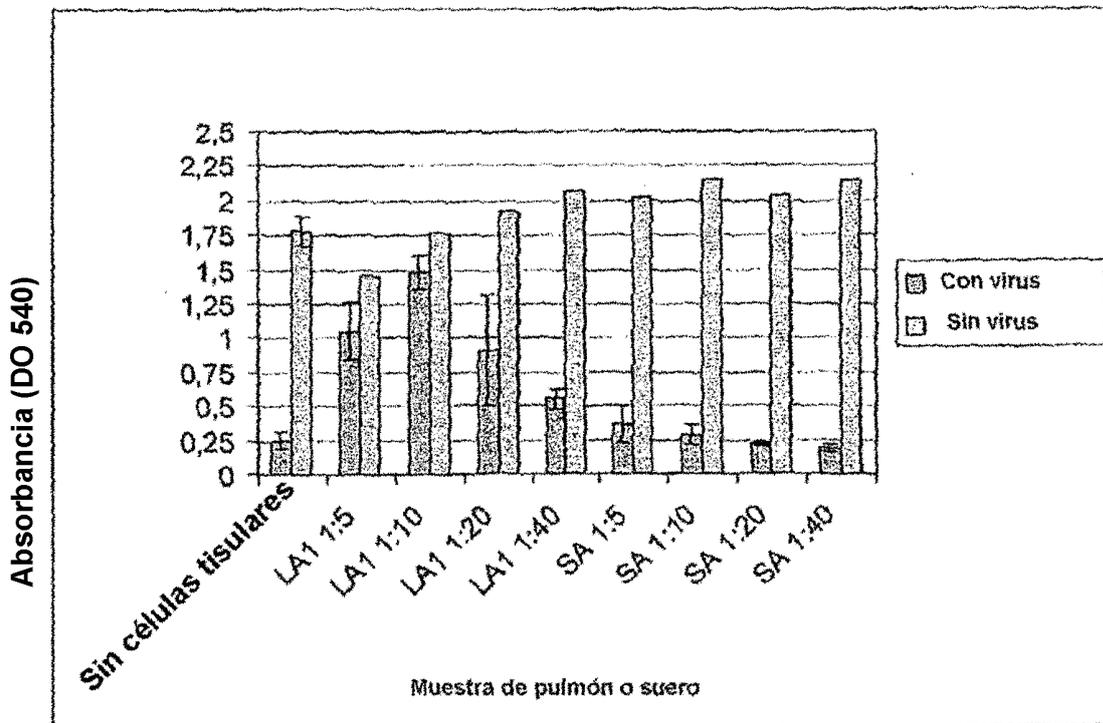


FIGURA 10

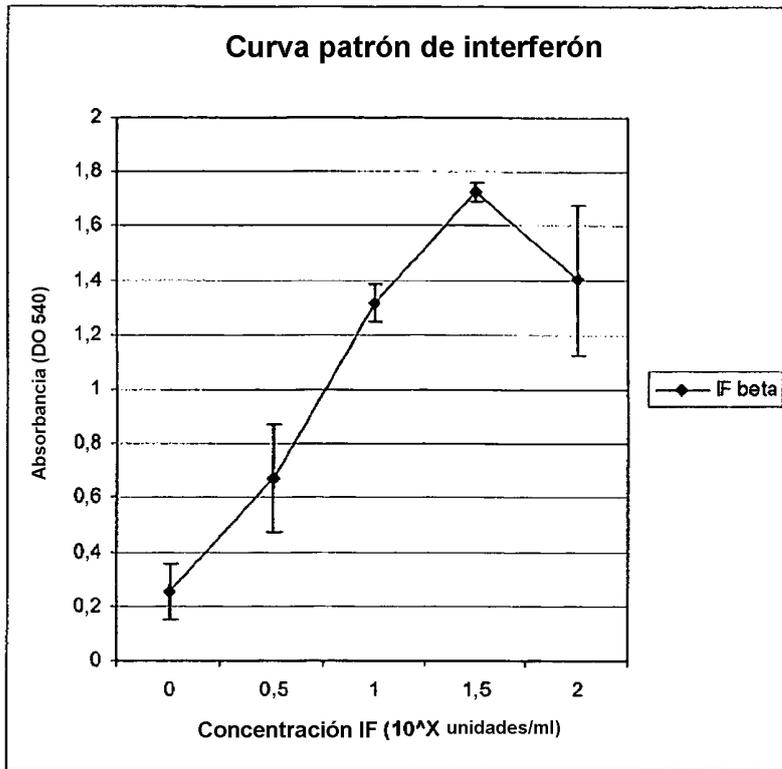


FIGURA 11

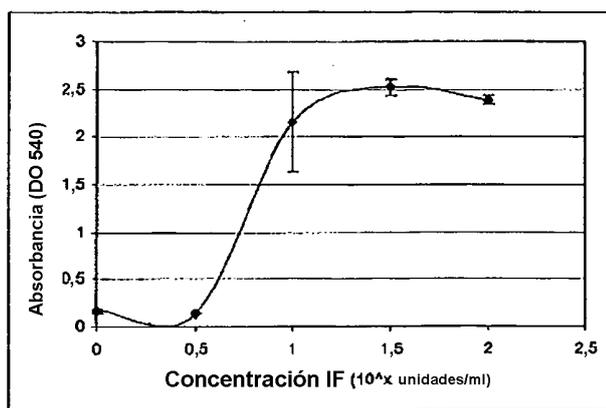


FIGURA 12