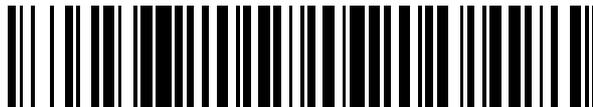


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 122**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/145** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2007 E 07732910 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.11.2014 EP 2019685**

54 Título: **Virus interferente defectuoso**

30 Prioridad:

**24.05.2006 GB 0610342**  
**02.10.2006 GB 0619445**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**20.01.2015**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**DIMMOCK, NIGEL**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 527 122 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

Virus interferente defectuoso

## 5 CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere al campo de la virología y a la prevención y/o el tratamiento de infecciones víricas, en particular gripe A, en animales, lo que incluye aves y seres humanos. La invención se refiere también al campo del tratamiento con antivirales. La invención se refiere además a procedimientos para la producción de virus  
10 Interferentes Defectuosos (ID), es decir, "virus ID", para su uso como un agente activo en la prevención y/o el tratamiento de una infección vírica. Un "virus ID" es un virus "interferente defectuoso" definido, normalmente clonado. Un "virus interferente" es normalmente un virus defectuoso que interrumpe el ciclo normal de replicación e infección de un virus no defectuoso. (En la técnica se conocen preparaciones de virus ID de la gripe, pero son genéticamente heterogéneas).

15

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La *Orthomyxoviridae* es una familia de virus de ARN que infecta a los vertebrados. La familia incluye los virus causantes de la gripe.

20

La gripe es una infección vírica del sistema respiratorio caracterizada por fiebre, tos y dolores musculares intensos. Existen tres géneros de virus de la gripe, identificados por diferencias antigénicas en su nucleoproteína y su proteína de matriz: *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B* e *Influenzavirus C*.

25 Los virus de la gripe A y B contienen cada uno ocho segmentos de ARN monocatenario (ARNmc). Los virus comprenden proteínas de viriones externos principales, hemaglutinina (H) y neuraminidasa (N), de las que existen 16 subtipos H y 9 subtipos N que probablemente forman todas las 144 permutaciones posibles.

El virus de la gripe C contiene siete segmentos de ARNmc, dado que el virus carece de gen de la neuraminidasa separado (véase Lamb, R. y Krug, R. M. (1996) capítulo 45; *Orthomyxoviridae: The virus and their replication* - Fields Virology, 3.<sup>a</sup> edición, Raven Publishers, Filadelfia).

30

El principal agente causante de la gripe humana es el virus de tipo A. El genoma del virus consiste en ocho segmentos de ARN monocatenario de sentido negativo. El ARN codifica 9 proteínas estructurales y 2 proteínas no  
35 estructurales. Se sabe que codifican las proteínas del virus de la gripe según se expone a continuación:

Segmento 1 codifica la proteína de la polimerasa PB2

Segmento 2 codifica la proteína de la polimerasa PB1

Segmento 3 codifica la proteína de la polimerasa PA

40 Segmento 4 codifica la proteína de la hemaglutinina (HA).

Segmento 5 codifica la proteína de la neuraminidasa (ND).

Segmento 6 codifica la nucleoproteína (NP).

Segmento 7 codifica dos proteínas de matriz (M1 y M2).

Segmento 8 codifica dos proteínas no estructurales (NS1 y NS2).

45

Los virus de la gripe humana A y B son responsables de la enfermedad estacional en las personas, pero sólo los virus de la gripe A provocan pandemias mundiales. En los virus humanos se han identificado tres hemaglutininas diferentes, referidas como H1, H2 y H3 y dos neuraminidasas distintas, referidas como N1 y N2. Los virus se clasifican en subtipos según sus proteínas de hemaglutininas y neuraminidasas constituyentes. Por ejemplo, la cepa  
50 vírica que provocó la pandemia de gripe "española" de 1918 pertenece al subtipo H1N1. El subtipo H2N2 apareció en 1957 y sustituyó al H1N1; el subtipo H3N2 apareció en 1968 y sustituyó al H2N2. Cada episodio de sustitución se conoce como deriva antigénica, y produce una pandemia ya que toda la población humana carece de inmunidad eficaz contra el nuevo virus. Después de una deriva, las principales proteínas de la superficie vírica H y N experimentan cambios antigénicos continuos y progresivos denominados deriva antigénica. Los virus de esta deriva  
55 provocan epidemias anuales de gripe. En la actualidad están circulando conjuntamente los descendientes de la deriva de H3N2 y H1N1 (que reaparecieron en 1977). El virus de la gripe B no provoca gripe pandémica pero contribuye a las epidemias.

Sin embargo, la mayoría de los virus de la gripe A existen en diversas aves acuáticas, en las que provocan

infecciones subclínicas del tracto digestivo. Por ejemplo, en octubre de 2003, una epidemia de gripe en pollos empezó a difundirse a través de varios países a orillas del Pacífico (Vietnam, Tailandia, Japón, China, Corea del Sur, Camboya), y recientemente ha llegado a Europa. Este virus se designa como H5N1. La molécula H5 es común entre los virus de la gripe aviar pero no se han encontrado en virus de la gripe que provocan epidemias humanas. Sin embargo, desde entonces se han producido casos humanos esporádicos de H5N1 (con una tasa de mortalidad alarmantemente alta) y suscitan una importante preocupación.

Los estudios genómicos sugieren que los virus pandémicos humanos procedieron de virus aviares que se adaptaron a los seres humanos (1918), o que interaccionaron genéticamente con un virus humano existente (1957 y 1968). Así, cuando los virus aviares (tales como H5N1 y H7N7) se trasladan desde su hospedador natural a las aves domésticas y en estrecho contacto con seres humanos, existe la preocupación de una posible emergencia de un nuevo virus pandémico. Sin embargo, ninguno de estos virus se transmite actualmente con eficacia de persona a persona. Todos los nuevos virus pandémicos altamente infecciosos provocan una alta morbilidad y mortalidad, con una estimación de 50 millones de muertes en todo el mundo para el virus de 1918 y de 1 a 5 millones para los virus de 1957 y 1968. Aunque una infección gripal provoca una intensa respuesta inmunitaria contra la cepa que la provocó, la velocidad con la que aparecen las cepas por deriva antigénica deja pronto a un individuo previamente infectado susceptible a una nueva infección. Se dispone de vacunas de la gripe comercialmente desde hace muchos años e incluyen vacunas inactivadas y atenuadas. Algunas vacunas contienen partículas de virus inactivados o más comúnmente sólo los componentes H y N purificados. Estas vacunas han mostrado utilidad para reducir la magnitud y la gravedad de las epidemias de gripe. Sin embargo, debido al fenómeno de la deriva antigénica, las cepas de la gripe usadas como base de las vacunas existentes son reevaluadas de un año a otro por la OMS y pueden haber sido cambiadas. Además, cualquier nueva vacuna necesaria para un nuevo virus pandémico necesitaría varios meses antes de que pudiera ponerse a disposición para su administración.

Otras líneas de defensa contra la gripe incluyen los fármacos antivirales. Por ejemplo, la Amantadina y la Rimantadina inhiben la acción de una de las proteínas de matriz necesarias para obtener el ARN vírico en el citosol. Estos fármacos son eficaces frente a todos los virus de la gripe de tipo A (pero no frente a los virus de tipo B) si bien se ha observado una rápida evolución de resistencia a los fármacos.

Alternativamente, el Zanamivir (Relenza®) y el Oseltamivir (Tamiflu®) bloquean la neuraminidasa y así actúan para inhibir la liberación de viriones en la progenie de las células infectadas y la extensión de la infección. Sin embargo, la eficacia de estas terapias resulta un tanto limitada. El tratamiento debe iniciarse inmediatamente después de la infección, se suministra dos veces al día, y tiene sólo capacidad para acortar la duración de los síntomas a entre uno y tres días. Se están encontrando virus resistentes al Tamiflu en pacientes con gripe.

Es inevitable otra pandemia de la gripe, y se espera que produzca una extensa morbilidad y más de un millón de muertes en todo el mundo, a pesar de los desarrollos en vacunología y fármacos antivirales. Es necesario tomar urgentemente nuevas medidas para combatir la gripe.

Los virus ID tienen una larga historia. Fueron descubiertos como elementos auto-interferentes en preparaciones del virus de la gripe A por von Magnus quien los estudió a finales de los años 1940 y principios de los 1950 (véase, por ejemplo, von Magnus, P (1947) Ark. Kemi. Mineral. Geol, 24b:1). Durante muchos años estos elementos interferentes recibieron el nombre de su descubridor. Más adelante, cuando se comprendió que estos elementos estaban presentes casi universalmente en los virus, fueron denominados virus ID (véase por ejemplo Huang & Baltimore (1970) Nature 226: 325 -327). El interés en los virus ID alcanzó un máximo en la década de 1970, pero después disminuyó debido a una expectativa exagerada sobre su actividad antiviral *in vivo*.

Todos los virus de la gripe A parecen tener un aparato de replicación que permite el intercambio de segmentos del genoma (reordenación) en células doblemente infectadas, lo que confiere a estos virus una inmensa flexibilidad genética. Dicho episodio dio lugar a los virus pandémicos de 1957 y 1968. Además del proceso normal de replicación, se producen errores en la replicación que dan origen a pequeños ARN de 400-500 nt que carecen de aproximadamente el 80% de la secuencia central de la plantilla, lo que parece proceder de una copia de la polimerasa en la parte inicial de la plantilla, la separación de la plantilla y después la reunión y copia del otro extremo. Estos pequeños ARN conservan las señales de replicación y encapsidación terminales, y su pequeño tamaño sugiere que pueden hacerse más copias por unidad de tiempo que en el segmento de ARN de longitud completa. La encapsidación de ARN genómicos parece ser un proceso organizado de manera que un virión contiene sólo una copia de cada uno de los 8 segmentos. Un virión no parece discriminar entre un ARN defectuoso y uno de longitud completa, con lo que cuando existe un exceso de ARN defectuosos preferentemente experimentan una encapsidación. Una partícula que contiene el segmento de genoma suprimido no puede sintetizar la proteína o

proteínas virales codificadas normalmente por ese ARN, y es no infeccioso, aunque puede replicarse en *trans* cuando esa célula es infectada por un virus de la gripe A. La incorporación de ARN defectuosos en viriones produce una reducción en la cantidad de virus infecciosos producidos. Así, los viriones que transportan un genoma suprimido se conocen como virus interferentes o interferentes defectuosos (ID).

5

Por tanto, los virus de la familia *Orthomyxoviridae* dan origen espontáneamente a segmentos de ADN defectuosos como resultado de una delección interna (75-80% de los nucleótidos) en uno o más segmentos genómicos. El genoma de virus ID es por tanto una forma suprimida del genoma del virus infeccioso que dio lugar a él; y posee varias propiedades singulares que lo distinguen de otros tipos de moléculas de ácidos nucleicos víricos defectuosos (véase Dimmock, N. J. (1996) "Antiviral activity of interfering defective influenza virus in vivo" - Viral and other infections of human respiratory tract; S. Myint y D. Taylor-Robinson (ed.), Chapman & Hall).

En comparación con un virus activo, es decir, vivo o infeccioso, un virus ID es no infeccioso y se replica sólo cuando su genoma está presente en una célula que ha sido infectada por un virus con un genoma completo (referido a veces como "virus auxiliar"). El virus ID de la gripe se encapsida en partículas de virus que habitualmente son indistinguibles en tamaño y composición de proteínas de las partículas de virus infecciosos.

Después de aparecer, *de novo*, un genoma ID se amplifica rápidamente en concentración con respecto al genoma del virus infeccioso, de manera que dentro de unos pocos ciclos infecciosos (o pasos) existen más virus ID en una población que virus infeccioso.

El virus ID tiene capacidad para interferir a escala intracelular con el virus infeccioso de manera que es capaz específicamente de inhibir la multiplicación de virus infeccioso.

Los estudios con animales *in vivo* han demostrado que los virus ID de la gripe A producidos espontáneamente (A/equino/Newmarket/7339/79 (H3N8)) pueden, en cantidad suficiente, proteger a los ratones de la prueba de provocación de gripe A letal con el virus homólogo (EQV) o con los subtipos de virus heterólogo A/WSN (H1N1) o A/PR/8/34 (H1N1). En estos estudios la preparación de virus ID fue tratada con radiación UV con el fin de inactivar cualquier virus auxiliar vivo presente. Una única administración parecía proporcionar profilaxis para hasta 5 días aproximadamente. Sin embargo, estas preparaciones de virus ID fueron heterogéneas y estuvieron formadas por una multiplicidad de secuencias de ARN defectuoso no definidas de diferentes segmentos genómicos (véase Noble y Dimmock (1994) J. Gen. Virol. 75: 3485 - 3491).

El virus ID A/WSN (H1N1) cultivado en huevos embrionados protegía a los ratones contra la prueba de provocación letal con A/WSN (H1N1). La comparación entre especies de ARN de virus ID cultivados en huevos y ARN de virus ID extraído de pulmones de ratones supervivientes demostró que había 5 ARN posibles responsables de la supervivencia de los ratones. Cada una de las cinco especies de ARN de virus ID tenía una delección interna (véase Noble & Dimmock (1995) Virology 210: 9-19). Los extremos 3' y 5' de cuatro de estas especies de ARN parecían intactos.

40

Duhaut y Dimmock (2000, Virology 275: 278 - 285) modificaron un ARN de segmento 1 defectuoso de EQV colocándolo bajo el control de un promotor de la polimerasa I de ARN humano (POLI) en un plásmido: cada uno de los plásmidos codificaba un ARN de aproximadamente 400 nucleótidos pero, debido a la posición exacta de la delección interna, se conservaron diferentes longitudes de las secuencias de los extremos 5' y 3'. Se transfectaron células Vero con cada plásmido junto con uno de los tres subtipos diferentes de virus auxiliares, incluido el progenitor (H3N8) o un subtipo H2N2 o H1N1. Se realizó un paso en serie en el cultivo celular. Se encontró que eran necesarios al menos 150 nucleótidos en el extremo 5' del ARN de virus ID para un paso fiable *in vitro* en cada una de las líneas celulares usadas junto con los virus auxiliares en particular utilizados.

No ha sido posible dirimir experimentalmente el proceso por el cual los virus ID de la gripe A no clonados reducen el rendimiento de virus infeccioso, inhiben la citopatología inducida por virus y protegen a los animales de la enfermedad clínica, ya que la mayoría de las poblaciones de virus ID contienen muchas secuencias diferentes de ARN defectuoso, obtenidas de diferentes segmentos del genoma y con una variedad de delecciones centrales. Así el contenido de ARN de dichas poblaciones no clonadas de virus defectuoso no puede reproducirse de manera eficaz, 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 el ARN de virus ID obtenido de un sistema de plásmidos parece comportarse de forma auténtica en cultivo celular. Un plásmido (POLI-317) dio origen a ARN de virus ID que se replicaba de manera estable *in vitro* en presencia de virus auxiliar e inhibía intensamente la

producción del virus auxiliar en ese sistema.

Duhaut y Dimmock (2003, J. Virol. Methods 108: 75 - 82) describieron la preparación de un virus ID de la gripe A definido (es decir, clonado) generado enteramente a partir de plásmidos que se usaron para transfección de células del hospedador en cultivo. Los plásmidos usados codificaron ARN de ID (H3N8 o H7N7) y virus de la gripe infeccioso (A/WSN, H1N1). El virus ID generado de esta forma se hizo pasar una vez en huevos de pollo embrionados y a continuación se administraron a ratones en presencia de virus auxiliar (H1N1). Los virus ID clonados se propagaron intactos en pulmón de ratón. Los virus ID clonados (sin auxiliar infeccioso) se sometieron también a prueba para encontrar algún efecto protector en ratones contra una prueba de provocación letal (H1N1).  
 5 Se observó algún efecto profiláctico muy débil y de muy corta duración, pero esto sólo retrasó el inicio de los síntomas clínicos y la muerte en los ratones.  
 10

Noble y col. (2004, Vaccine 22: 3018 - 3025) refirieron un estudio *in vivo* en ratones usando una preparación de virus ID de ocurrencia natural (es decir, heterogénea e indefinida) (EQV H3N8). Se encontró que la administración de esta preparación de virus ID a ratones generaba protección de profilaxis durante un periodo, y al mismo tiempo convirtió una infección por lo demás letal en una infección inmunizante y avirulenta.  
 15

Dimmock y Marriott (2006, J. Gen. Virol. 87: 1259-1265) describieron una anomalía aparente en la que una preparación de virus ID heterogénea e indefinida protege firmemente a los ratones de la enfermedad letal causada por virus A/PR/8/34 (H1N1) y A/WSN/40 (H1N1), pero protege sólo marginalmente de una enfermedad causada por A/Japan/305/57 (A/Jap H2H2). Se encontró que A/Jap requiere unidades 300 veces más infecciosas para provocar una enfermedad clínica en ratones que A/PR8. Las proporciones de virus ID y virus de provocación fueron variadas y sometidas a ensayo. Una conclusión a la que llegaron fue que la eficacia del virus ID depende de la dosis infecciosa de virus de provocación más que su dosis causante de enfermedad.  
 20

Mann y col. (2006, Vaccine 24, 4290-4296) probaron ARN de ID A/EQV heterogéneos e indefinidos que habían sido rescatados por (A/PR8) en hurones. El virus ID se administró en dos dosis seguido por una prueba de provocación con A/Sydney 5/97 infeccioso (H3N2). Aunque la provocación infecciosa no era letal, los hurones tratados con virus ID mostraron solamente síntomas clínicos ocasionales y leves, en comparación con los animales de control que cayeron gravemente enfermos.  
 25  
 30

El documento US2006/0.057.116-A1 (Kawaoka y Neumann) describe plásmidos y un procedimiento de transfección y cultivo de células para producir virus de la gripe A recombinante *in vitro* en ausencia de cualquier virus auxiliar. Específicamente, los virus de la gripe A pueden prepararse completamente a partir de sus ADNc clonados en líneas celulares transfectadas. Las mutaciones pueden incorporarse en cualquier segmento génico.  
 35

El documento WO2006/051.069 (Solvay Pharmaceuticals & Erasmus University) desvela partículas de virus de la gripe condicionalmente defectuoso y un procedimiento para prepararlas. Desde el punto de vista de las células transfectadas que no son capaces de producir grandes cantidades de partículas de virus de la gripe defectuoso para su uso como vacunas, la memoria descriptiva enseña un procedimiento alternativo. El procedimiento contempla una célula transfectada con 7 segmentos de ARN del virus de la gripe y un octavo segmento en el que se suprime la secuencia de codificación de la polimerasa. La célula incluye un segundo plásmido de expresión que transporta la secuencia de la polimerasa eliminada. En la expresión, la célula transfectada produce partículas de virus "condicionalmente" defectuosos que sólo pueden replicarse en una línea celular que expresa la polimerasa que no está presente en el genoma defectuoso. Las partículas de virus de la gripe defectuoso sólo pueden replicarse una vez en animales o células hospedadores adecuados, aunque no complementados. Las partículas del virus condicionalmente defectuoso están destinadas a su uso en vacunas o con fines de administración génica y de este modo ventajosamente las preparaciones de partículas de virus son incapaces de replicarse en células normales y no contienen virus auxiliar o natural.  
 40  
 45  
 50

Aunque se ha descrito un prototipo (véase Duhaut y Dimmock, 2003, más arriba) para preparar un virus ID de la gripe A clonado (que pasa a ser sólo débilmente protector en una ocasión en ratones), no ofrece una vía práctica para preparar las cantidades necesarias de virus ID clonados que se necesitan para posteriores investigaciones de laboratorio, menos aún la cantidad de virus ID clonados que se necesitarían de forma rutinaria para realizar ensayos clínicos con animales y humanos o proporcionar profilaxis y/o terapia en situaciones rutinarias, endémicas o pandémicas.  
 55

Von Magnus, P. (1951a) Acta Pathol Microbiol Scand 28, 250-277; Von Magnus, P. (1951b) Acta Pathol Microbiol Scand 28, 278-293; Von Magnus, P. (1951c) Acta Pathol Microbiol Scand 29, 157-181; y von Magnus, P. (1954) Adv

Virus Res 21, 59-79 describen virus A/PR8 (H1N1) estándar (es decir, infecciosos) preparados por inoculación de huevos de pollo embrionados con "líquidos alantoicos diluidos 10<sup>-6</sup>". En la página 158 de von Magnus (1951a) se prepararon virus incompletos (es decir, virus ID) "por pasos en serie de líquidos alantoicos no diluidos" con "pasos 1º, 2º, 3º, etc. de virus no diluidos". Se realizaron hasta 4 pasos.

5

Fazekas de St Groth, S. & Graham, D. M. (1954). "The production of influenza virus particles among influenza strains. Experimentos en huevos". Brit J Exp Path 35, 60-74. También, Von Magnus, P. (1965) "The in ovo production of incomplete virus by B/Lee and A/PR8 influenza viruses". Arch Virol 17, 414-423. Estas referencias describen la producción de virus B/Lee (ID) incompleto en huevos de pollo embrionados. La producción necesitaba normalmente 6 o más pasos de virus no diluido.

10

Meier-Ewert, H. & Dimmock, N. J. (1970). "The role of the neuraminidase of the infecting virus in the generation of noninfectious (von Magnus) interfering virus". Virol 42, 794-798. Esta referencia describe la producción de virus (ID) A/Jap/305/57 (H2N2) incompleto. La tabla 2 muestra el modo en que la producción del virus requirió 3 pasos no diluidos en serie.

15

Rott, R. & Schafer, W. (1960) "Untersuchungen über die hamagglutinierenden-nichtinfektiosen Teilchen der Grippe-Viren. I. Die Erzeugung von 'inkompletten Formen' beim Virus der klassischen Geflügelpest (v. Magnus Phänomen)" Zeitschrift für Naturforschung 16b, 310-321; y Carter, M. J. & Mahy, B. W. J. (1982). Arch Virol 71, 12-25. Estas referencias describen el modo en que se produjo virus de la gripe aviar A incompleto (H7) mediante el paso en serie de líquidos de cultivo con alta multiplicidad, normalmente de virus no diluido. Los líquidos del cultivo celular se obtuvieron a partir de células de fibroblastos de embriones de pollo.

20

Huang, A. S. & Baltimore, D. (1970) "Defective viral particles and viral disease processes" Nature (Lond) 226, 325-327. Este artículo de revisión describe en la página 325 el modo en que se consigue la síntesis de partículas ID por tejidos celulares o animales en infección con altas multiplicidades (o virus de paso no diluido) para virus de la fiebre del Valle del Rift, virus de la estomatitis vesicular, virus de la peste aviar, virus del simio 40, virus del polioma, virus de la coriomeningitis linfocítica, virus de Sendai, virus de simio 5 y poliovirus.

25

Holland, J. J. (1990a) "Defective viral genomas" En Virology, 2ª ed., pág. 151-165. Editado por B. N. Fields & D. M. Knipe. Nueva York: Raven Press. En este artículo de revisión, en su página 155 se describe que el paso de virus no diluido en serie en cultivo celular (o huevos o animales) sigue siendo el procedimiento de elección para la generación de partículas ID de cualquier virus.

30

Holland, J. J. (1990b) "Generation and replication of defective viral genomes" En Virology, 2ª ed., pág. 77-99. Editado por B. N. Fields y D. M. Knipe. Nueva York: Raven Press. En referencia a la figura 2 este capítulo del libro desvela que las bandas de las partículas ID no aparecen hasta el cuarto paso (de virus no diluido).

35

Nayak, D. P., Chambers, T. M. & Akkina, R. K. (1985) "Defective-interfering (ID) ARNs of influenza viruses: origin, structure, expression and interference" Curr Topics Microbiol Immunol 114, 103-151 es un artículo de revisión que acredita la producción de los virus ID mediante paso independiente en serie no diluido de virus.

40

El virus ID de la gripe A clonado producido en cultivo celular no proporciona suficientes cantidades de virus clonado para su aplicación práctica. Un problema que pretende resolver la invención es cómo producir virus suficiente para estudios *in vivo* y para usos farmacéuticos.

45

El autor de la invención pretendía producir virus ID de la gripe A clonado por paso en huevos de gallina embrionados, pero obtuvo una producción de virus ID demasiado baja. Un problema que pretende resolver la presente invención es por tanto cómo proporcionar una producción suficiente de virus ID de la gripe A clonado por paso en huevos embrionados.

50

#### RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona un virus ID de la gripe A clonado para su uso como medicamento en el que la secuencia de nucleótidos de segmento 1 de ARN del virus ID de la gripe A clonado comprende: (a) una secuencia seleccionada entre SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; o (b) una secuencia de ácidos nucleicos de al menos el 99% de identidad con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

55

También se describe un procedimiento para la producción de un virus ID de la gripe A clonado que comprende: (a)

transfección de una célula con (i) un plásmido que comprende un segmento de ARN de un virus de la gripe A que tiene una delección en el mismo, y (ii) plásmidos que en combinación proporcionan los segmentos de ARN 1 a 8 de un virus de la gripe A infeccioso; (b) cultivo de las células transfectadas durante un periodo; (c) (i) introducción de una parte alícuota de menos de 100  $\mu$ l del medio de cultivo celular transfectado en un huevo embrionado; o (ii) toma de una parte alícuota del medio de cultivo celular transfectado y reducción del número o de la concentración de partículas de virus en esa parte alícuota e introducción de al menos una parte de la parte alícuota en un huevo embrionado; o (iii) introducción de medio de cultivo celular transfectado que contiene menos de  $4 \times 10^9$  copias del segmento de delección de ARN en un huevo embrionado; y (d) incubación del huevo durante un periodo; y (e) recuperación del material vírico del huevo.

10

Se describe también un procedimiento de producción de un virus ID de la gripe A clonado que comprende: (a) transfección de una célula con (i) un plásmido que comprende un segmento de ARN de un virus de la gripe A, teniendo el segmento una delección en el mismo, y (ii) plásmidos que en combinación proporcionan segmentos de ARN 1 a 8 de un virus de la gripe A infeccioso; (b) cultivo de las células transfectadas durante un periodo; (c) toma de una parte alícuota del medio de cultivo celular transfectado; (d) introducción de al menos una parte de esa parte alícuota en un huevo embrionado; (e) incubación del huevo durante un periodo; (f) (i) introducción en un huevo embrionado adicional de una parte alícuota de menos de 100  $\mu$ l de material vírico tomado del huevo incubado; o (ii) recuperación de una parte alícuota de material vírico del huevo incubado y reducción del número o la concentración de partículas de virus en esa parte alícuota e introducción de al menos una parte de esa parte alícuota en un huevo embrionado adicional; o (iii) introducción en un huevo embrionado adicional de material vírico que contiene menos de  $4 \times 10^9$  copias del segmento de delección de ARN tomado del huevo incubado; (g) incubación del huevo adicional durante un periodo; y (h) recuperación de material vírico del huevo.

Se describe también un procedimiento de producción de un virus ID de la gripe A clonado que comprende: (a) transfección de una célula con (i) un plásmido que comprende un segmento de ARN de un virus de la gripe A que tiene una delección en el mismo, y (ii) plásmidos que en combinación proporcionan segmentos de ARN 1 a 8 de un virus de la gripe A infeccioso; (b) cultivo de las células transfectadas durante un periodo; (c) introducción de al menos una parte de medio de cultivo celular transfectado en al menos 10 huevos embrionados; (d) incubación de al menos algunos de los huevos durante un periodo; y (f) recuperación de material vírico de al menos un huevo incubado.

Se describe también un procedimiento de producción de un virus ID de la gripe A clonado que comprende: (a) transfección de una célula con (i) un plásmido que comprende un segmento de ARN de un virus de la gripe A, teniendo el segmento una delección en el mismo, y (ii) plásmidos que en combinación proporcionan segmentos de ARN 1 a 8 de un virus de la gripe A infeccioso; (b) cultivo de las células transfectadas durante un periodo; (c) toma de una parte alícuota del medio de cultivo celular transfectado; (d) introducción de al menos una parte de esa parte alícuota en un huevo embrionado; (e) incubación del huevo durante un periodo; (f) introducción en al menos 10 huevos embrionados adicionales de al menos una parte del material vírico del huevo incubado; (g) incubación de los huevos adicionales durante un periodo; y (h) recuperación de material vírico de al menos un huevo.

40

Se describe también un procedimiento de paso de virus ID de la gripe A clonado, que comprende: (a) introducción de no más de  $4 \times 10^9$  copias de un genoma de la gripe A ID clonado en un huevo embrionado; (b) incubación del huevo durante un periodo; y (d) recuperación de material vírico del huevo.

En relación con todos los procedimientos mencionados anteriormente de producción o paso de virus de la gripe A interferentes defectuosos y clonados, se introducen preferentemente en un huevo embrionado al menos  $1 \times 10^7$  copias del genoma de la gripe A de ID clonado. El intervalo preferido de partículas de la gripe ID clonado individual, genomas o segmentos de ARN eliminados es de  $1 \times 10^7$  a  $4 \times 10^9$ . En otros aspectos preferidos, se usan no más de  $3 \times 10^9$ ,  $2 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $9 \times 10^8$ ,  $8 \times 10^8$ ,  $7 \times 10^8$ ,  $6 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $4 \times 10^8$ ,  $3 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $9 \times 10^7$ ,  $8 \times 10^7$ ,  $7 \times 10^7$ ,  $6 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $4 \times 10^7$ ,  $3 \times 10^7$  o  $2 \times 10^7$  partículas, genomas o segmentos eliminados.

En aspectos preferidos adicionales, se usan al menos  $3 \times 10^9$ ,  $2 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $9 \times 10^8$ ,  $8 \times 10^8$ ,  $7 \times 10^8$ ,  $6 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $4 \times 10^8$ ,  $3 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $9 \times 10^7$ ,  $8 \times 10^7$ ,  $7 \times 10^7$ ,  $6 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $4 \times 10^7$ ,  $3 \times 10^7$  o  $2 \times 10^7$  partículas, genomas o segmentos eliminados, sujeto a la lista mencionada anteriormente de límites superiores para partículas, genomas o segmentos eliminados.

El autor de la invención ha encontrado que es preciso inocular 10 veces menos, preferentemente 100 veces menos, incluso 1.000 veces menos material vírico en huevos embrionados (en comparación con las enseñanzas existentes en la técnica) con el fin de producir cantidades prácticas de virus ID de la gripe A clonado.

Se describe también un procedimiento de paso de un virus ID de la gripe A clonado que comprende: (a) introducción de una parte alícuota de la que se sabe o se sospecha que contiene una partícula de virus ID de la gripe A clonado en un huevo embrionado, en la que el volumen de la parte alícuota introducida es inferior a 100 µl; (b) incubación del 5 huevo durante un periodo; y (c) recuperación de material vírico del huevo.

Se describe también un procedimiento de paso de un virus ID de la gripe A clonado que comprende: (a) introducción de una parte alícuota de la que se sabe o se sospecha que contiene una partícula de virus ID de la gripe A clonado en al menos 10 huevos embrionados; (b) incubación de al menos algunos de los huevos durante un periodo; y (c) 10 recuperación de material vírico de al menos un huevo incubado.

Se describe también un procedimiento de paso de un virus ID de la gripe A clonado que comprende: (a) reducción del número o la concentración de virus en una parte alícuota de la que se sabe o se sospecha que contiene una partícula de virus de la gripe A ID clonado; (b) introducción de al menos una parte de la parte alícuota en un huevo 15 embrionado; (c) incubación del huevo durante un periodo; y (d) recuperación de material vírico del huevo.

En los procedimientos relevantes descritos anteriormente, son posibles partes alícuotas de menos de 100 µl de medio de cultivo (o partes alícuotas obtenidas de un huevo) preferentemente un volumen en el intervalo 0,1-100 µl.

20 El volumen de la parte alícuota es más preferentemente inferior a 50 µl, más preferentemente todavía inferior a 10 µl. Son posibles incluso volúmenes menores de parte alícuota de menos de 1 µl o menos de 0,1 µl.

Se describen volúmenes de parte alícuota en el intervalo 0,05 µl-10 µl; 0,1 µl-100 µl; 10-100 µl; 0,1 µl-10 µl; 0,1 µl-20 µl o 0,1 µl-50 µ.

25 La parte alícuota de menos de 100 µl de medio de cultivo (o parte alícuota de huevos), o la parte alícuota tal como se ha definido anteriormente, puede diluirse antes de introducir el total diluido, o al menos una parte de la parte alícuota diluida, en huevos embrionados.

30 En conjunto, el empleo de una parte alícuota del medio de cultivo (o huevo) de un volumen inferior a 100 µl (o tal como se ha definido anteriormente) produce un inóculo para el huevo embrionado con lo que está presente un número o concentración reducidos de partículas de virus en el inóculo. Por "reducido" se entiende reducido en relación con los números y/o concentraciones de partículas de virus que se encuentran normalmente en los volúmenes usados en la técnica como inóculos para el paso de virus en huevos embrionados, por ejemplo 35 superiores a 100 µl, normalmente de 1 ml-2 ml.

Se describe la clave para producir grandes cantidades de virus ID clonados pudiendo inocular un medio de cultivo celular transfectado en una multiplicidad de huevos embrionados.

40 Se describe también la producción de virus ID de la gripe clonados que comprende (a) transfección de una célula con (i) un plásmido que comprende un segmento de ARN de un virus de la gripe A que tiene una delección en el mismo, y (ii) plásmidos que en combinación proporcionan segmentos de ARN 1 a 8 de un virus de la gripe A infeccioso; (b) cultivo de las células transfectadas durante un periodo; (c) introducción de al menos una parte de medio de cultivo celular transfectado en al menos 10 huevos embrionados, (d) incubación de al menos algunos de 45 los huevos durante un periodo; y (f) recuperación de material vírico de al menos un huevo incubado.

El medio de cultivo celular transfectado estará normalmente en el intervalo de 0,1 µl-100 µ. De acuerdo con la invención, estos volúmenes pueden distribuirse entre más de 10 huevos embrionados.

50 En realizaciones preferidas, el medio de cultivo celular transfectado se distribuye entre más de 10, preferentemente más de 25, opcionalmente más de 50 huevos.

Pueden inocularse hasta 100, 150, 200, 250, 500, 1.000, 2.000, 5.000 o más huevos con medio de cultivo a partir de un único cultivo celular transfectado. La invención se abre por lo tanto al campo para la producción de grandes 55 cantidades de virus ID de la gripe A clonado con vistas a aplicaciones de investigación y farmacéuticas/veterinarias.

Puede existir una multiplicidad de pasos en los que después de la recuperación de material de virus ID a partir de huevos, el cultivo o el paso del virus se repiten una o más veces. El número de pasos en huevos puede ser de 3, 4 ó

5 con el fin de generar el rendimiento necesario de un virus ID clonado.

En los procedimientos mencionados anteriormente en los que existe una etapa para reducir el número o concentración de partículas de virus antes de la introducción de material vírico en huevos, esta etapa puede tener 5 lugar durante dos o más pasos, opcionalmente durante todos los pasos en huevos embrionados.

Además de la medida de partículas del virus ID de la gripe A usando una sonda y/o cebadores específicos, la cantidad de material de virus ID de la gripe A en un medio de cultivo o parte alícuota puede reflejarse mediante el número o concentración de partículas de virus totales, es decir, incluyendo todo posible virus auxiliar que esté 10 presente.

Antes de un procedimiento de paso de virus en una parte alícuota de la que se conoce o se sospecha que contiene una partícula de virus ID clonado, la parte alícuota en cuestión puede obtenerse anteriormente introduciendo material de partida de la que se sabe o se sospecha que contiene el virus clonado en un huevo embrionado e 15 incubando el huevo durante un periodo. Así, en algunas realizaciones no se necesita haber verificado que una muestra contiene realmente virus ID de la gripe A clonado; el paso puede realizarse a ciegas en una parte alícuota de partida, de manera que los resultados determinan la presencia o ausencia de virus ID de la gripe A clonado en el inóculo.

20 El material de partida al que se hace referencia anteriormente se obtiene preferentemente a partir de un cultivo celular transfectado. Las células son preferentemente células Vero, más preferentemente células HEK293T + células MDCK.

En un procedimiento de paso tal como se describe anteriormente, pueden existir uno o más pasos adicionales, en 25 los que se introduce material vírico recuperado en un huevo embrionado y se incuba el huevo durante un periodo seguido por la recuperación de material vírico adicional del huevo.

Pueden realizarse uno o más pasos, en los que la inoculación y la incubación de huevos se repiten una o más veces.

30 En cada uno de los procedimientos descritos anteriormente, la concentración de partículas de virus puede reducirse por dilución. La dilución puede ser al menos 1/2, preferentemente al menos 1/10, más preferentemente al menos 1/100, más preferentemente todavía al menos 1/1.000. Otras diluciones preferidas pueden incluir, por ejemplo, 1/3, 1/4, 1/5, 1/6, 1/7, 1/8, 1/9, 1/11, 1/12, 1/13, 1/14, 1/15, 1/20, 1/25, 1/30, 1/35, 1/40, 1/50, 1/60, 1/70, 1/80, 1/90, 35 1/200, 1/300, 1/400, 1/500, 1/600, 1/700, 1/800, 1/900, 1/2.000, 1/3.000, 1/4.000, 1/5.000 ó 1/10.000. Puede realizarse dilución en serie, por ejemplo una dilución de 1/2 seguida por una dilución de 1/10. Opcionalmente, puede tomarse una parte alícuota de la primera dilución antes de realizar la segunda dilución en esa parte alícuota.

Alternativamente, el número de partículas de virus puede reducirse por dilución (tal como se describe anteriormente) 40 seguido por la toma de al menos una parte del volumen diluido resultante. La parte o parte alícuota posterior puede completarse a continuación hasta un volumen deseado.

La etapa de dilución puede usarse para conseguir un intercambio de tampón o alteración en los componentes de la solución.

45 La infectividad de una preparación de partículas de virus producida por procedimientos de la presente invención puede determinarse tal como se conoce en la técnica usando una valoración de ensayo en placa en células MDCK en agar mediante procedimientos estándar. Una preparación de virus ID de la gripe A de la invención tiene preferentemente menos de  $10^6$  unidades de formación de placa por unidad HA, y puede tener apenas  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  ó 50  $10^2$  unidades de formación de placa por unidad HA.

La cantidad total de virus presente en una preparación de virus ID puede determinarse de forma adicional o independiente usando una prueba de hemaglutinación (HA) estándar con glóbulos rojos de pollo (por ejemplo de Serotech u otros proveedores comerciales). Una parte alícuota de concentración o número de partículas de virus ID 55 reducidos de acuerdo con la invención puede contener no más de aproximadamente 400 unidades HA, preferentemente no más de aproximadamente 100 unidades HA, más preferentemente no más de aproximadamente 40 unidades HA. En otras realizaciones preferidas una parte alícuota de partículas de virus ID de la gripe A empleadas en los procedimientos de la invención puede tener menos de  $10^2$  unidades HA, lo que incluye menos de 99, 98, 97, 96, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5 ó 1 unidades HA. Partes

alícuotas de menos de  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$  ó  $10^4$  unidades HA están también dentro del alcance de la invención.

El virus ID de la gripe A clonado puede estar en forma de una preparación en la que al menos el 75%, preferentemente al menos el 85%, más preferentemente al menos el 90%, más preferentemente todavía al menos el 95% de todas partículas de virus en la preparación son genéticamente idénticas.

El autor de la invención ha encontrado que las preparaciones de virus ID de la gripe A clonado preparado tal como se describen en la presente memoria descriptiva comprenden hasta el 99,9% de virus con el segmento de ARN eliminado, obteniéndose el equilibrio con virus (auxiliar) natural o de ocurrencia natural. Las preparaciones pueden comprender hasta el 99,8%, el 99,7%, el 99,6%, el 99,5%, el 99,4%, el 99,3%, el 99,2%, el 99,1%, el 99%, el 95%, el 90%, el 85% o el 80% de virus ID de la gripe A clonado como total de partículas de virus o genomas.

En realizaciones preferidas sustancialmente todas las partículas de virus ID de la gripe A en la preparación son genéticamente idénticas, más preferentemente todas las partículas de virus ID son genéticamente idénticas.

Los virus ID clonados de la gripe de la invención comprenden preferentemente 8 segmentos de ARN teniendo al menos uno de los segmentos una deleción. La deleción puede producir que parte o la totalidad de un gen que codifica un antígeno de superficie sea eliminado. En otros aspectos puede eliminarse parte o la totalidad de un gen de la polimerasa.

Una parte alícuota de la preparación del virus puede someterse a irradiación con luz UV con el fin de inactivar al menos una parte de virus de la gripe A infeccioso (es decir, virus auxiliar) presente en la parte alícuota. Se espera que la cantidad de radiación requerida sea proporcional a la cantidad de virus infeccioso presente en la parte alícuota. La UV se dirige a ARN. Generalmente, puede bastar una dosis baja de irradiación UV. Puede calibrarse una lámpara UV para conseguir una inactivación de  $1 \log_{10}$  de infectividad del virus de la gripe en 4 segundos. Por tanto se lleva a cabo irradiación UV a 253,7 nm a aproximadamente 10 cm y con una profundidad de muestra de 2 mm con una lámpara de 8 vatios en el intervalo de 5 segundos a 3 minutos, preferentemente de 10 segundos a 2 minutos, más preferentemente de 30 segundos a 90 segundos. La irradiación UV reduce preferentemente la infectividad de una preparación de un virus ID de la gripe A producida por procedimientos de la invención hasta niveles de menos de  $10^5$  UFP por unidades HA, preferentemente menos de  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  ó  $10^2$  UFP por unidad HA.

Puede conseguirse la inactivación completa de todo el ARN viral, incluido el ARN de virus ID mediante irradiación UV durante aproximadamente 8 minutos, opcionalmente 4 minutos.

La invención proporciona un virus ID de la gripe A clonado para su uso como medicamento. El medicamento es preferentemente un antiviral. Los autores de la invención han encontrado que el virus ID de la gripe A clonado actúa como un agente antiviral. Por otra parte, la acción antiviral es universal contra todas las cepas o subtipos de gripe A. El virus ID de la gripe A clonado que es administrado puede por tanto ser el mismo o diferente subtipo que el virus de la gripe A adquirido naturalmente por un individuo. No se necesita adyuvante, dado que el efecto antiviral del medicamento no es inmunológico en su base, aunque los autores de la invención han encontrado también una respuesta inmunológica secundaria. La acción antiviral es inmediata y protectora para el individuo al que se administra. Además, no se necesita administrar virus auxiliar. El virus ID de la gripe A clonado administrado de la invención tiene una semivida significativa en el organismo del sujeto al que se administra. Puede tener lugar una readministración hasta una semana, dos semanas, tres semanas o un mes más tarde con el fin de reiniciar un efecto protector latente, de manera que el efecto protector proviene de la infección del individuo con un virus de la gripe A de ocurrencia natural del mismo o diferente subtipo.

Sin pretender estar limitados por ninguna teoría, los autores de la invención opinan que la presencia de virus de la gripe A natural o de ocurrencia natural de cualquier subtipo en presencia de virus ID de la gripe A clonado de la invención, produce una complementación del segmento defectuoso de manera que el virus ID de la gripe puede replicarse a expensas del virus natural o de referencia en las células del hospedador. Una consecuencia es que la virulencia del virus natural o de referencia se reduce lo que permite que el tiempo en el organismo desencadene una respuesta inmunitaria eficaz contra el virus natural o de referencia. El virus ID de la gripe A clonado de la invención no es por tanto una vacuna, sino un agente viral interferente de aplicación universal contra subtipos de la gripe A.

Se describe también el uso de un virus ID de la gripe A clonado que puede obtenerse mediante cualquiera de los procedimientos de la invención.

Se usa un virus ID de la gripe A clonado para la fabricación de un medicamento antiviral para la prevención o

tratamiento del mismo o diferente subtipo de gripe A en un individuo.

En un aspecto adicional, la invención incluye el uso de un virus ID de la gripe A clonado para la fabricación de un medicamento para convertir una infección por cepa virulenta del virus de la gripe A en un individuo en una infección  
5 avirulenta. La cepa virulenta de gripe A puede ser de cualquier tipo, ya sea una cepa humana, animal o aviar.

La invención proporciona ventajosamente el uso de un virus ID de la gripe A clonado para la fabricación de un medicamento para proporcionar un efecto protector inmediato y no inmunológico en un individuo infectado, o con sospecha de haber sido infectado con gripe A.

10

Los autores de la invención proporcionan por tanto antivirales basados en ARN de gripe interferente defectuoso de ocurrencia natural que tiene la capacidad de proteger frente a cualquier virus de la gripe A en cualquier hospedador. Este denominado "ARN protector" de secuencia conocida está encapsidado preferentemente en partículas de virus, y preferentemente se suministra por administración intranasal a las células del aparato respiratorio a las que se  
15 dirige de forma natural el virus de la gripe infeccioso. Una pequeña dosis de lo que los autores de la invención denominan "virus protector" (es decir, virus ID clonado) ejerce una potente protección profiláctica en ratones contra una infección gripal letal, y proporciona un beneficio terapéutico. El virus protector proporcionará una opción importante para combatir la gripe en personas, en particular cuando la cepa de virus no es conocida o es resistente a fármacos antivirales.

20

Los autores de la invención han obtenido preparaciones de virus que contienen un único ARN defectuoso dominante. Estas preparaciones de virus ID clonado, también denominadas preparaciones de "virus protector" para distinguirlas de la actividad de los 'virus interferentes' en células en cultivo, tienen la capacidad de proteger a los animales, incluidos los seres humanos, de infección grave con los virus de la gripe A. En algunas realizaciones, los  
25 autores de la invención han preparado "virus protector" con aproximadamente 50 veces más actividad profiláctica frente al virus de la gripe A en ratones que con virus ID no clonado. La preparación de "virus protector" proporciona beneficio terapéutico.

La secuencia de ARN de "virus protector" permite ventajosamente verificar la autenticidad de los lotes, medir la  
30 actividad específica y determinar el mecanismo de acción de los ARN protectores individuales.

Una ventaja importante del virus protector es que se espera que funcione contra cualquier subtipo o cepa de virus de la gripe A. Es improbable que aparezcan virus resistentes al virus protector ya que el principio activo, que protege el ARN, usa la misma maquinaria de replicación que el ARN genómico.

35

En consecuencia, una ventaja es que un individuo en el que se sabe o se sospecha que ha sido infectado por un virus de la gripe A puede ser tratado de la infección, incluso si los síntomas de infección todavía tienen que observarse o la infección tiene que diagnosticarse. Puede administrarse al individuo con el medicamento de la gripe A con ID clonado lo antes posible en cuanto se sospeche la infección. Los individuos también pueden resultar  
40 infectados lo antes posible después de haber estado en contacto con otros individuos de la misma especie o de otra diferente y para los que se sabe o se sospecha que han sido infectados con gripe A. Ventajosamente, no se cree que la protección implique una respuesta inmunitaria y se consigue en la administración del medicamento de virus ID clonado en solitario sin necesidad de administración de virus auxiliar. Por tanto no se requiere administrar el virus ID clonado antes de la infección como en una vacuna convencional (que depende de la respuesta inmunitarias para  
45 generar un efecto protector).

Los medicamentos de la invención pueden administrarse a individuos de forma preventiva. Por ejemplo, los trabajadores sanos y las personas que trabajan con animales o aves (muertos o vivos) y que están en riesgo de exposición al virus de la gripe A.

50

En un aspecto adicional más, la invención incluye el uso de un virus ID de la gripe A clonado para la fabricación de un medicamento para vacunar a un individuo contra la gripe A, en el que el medicamento comprende además al menos una cepa viva de gripe A, y el medicamento es adecuado para administración separada, simultánea o en secuencia del virus ID de la gripe A con la cepa viva (auxiliar). La cepa auxiliar puede ser un virus de la gripe A de  
55 cualquier tipo, ya sea de seres humanos, animales o aves.

El autor de la invención ha desvelado que un virus ID de la gripe A clonado es capaz de actuar junto con un virus auxiliar a modo de vacuna contra la cepa de virus de la gripe A en particular. Al mismo tiempo, la administración de virus ID de la gripe A clonado tiene también un efecto antiviral.

En consecuencia, la invención proporciona un procedimiento de vacunación de un individuo contra una cepa de virus de la gripe A y simultáneamente el tratamiento del individuo contra una infección causada por cualquier cepa de virus de la gripe A, que comprende la administración de una cantidad eficaz de un virus ID clonado y un virus vivo de la gripe A.

Además, la invención proporciona el uso de un virus ID de la gripe A clonado para la fabricación de un medicamento que comprende además una cepa de virus vivo de gripe A, en el que el medicamento es una vacuna contra la capa de virus de la gripe y un agente antiviral contra cualquier cepa de virus de la gripe.

En realizaciones preferidas, el medicamento es administrado por vía intranasal. Otras vías de administración pueden incluir la cavidad mucosa, pulmonar y oral. Otras vías incluyen la vía gastrointestinal por administración oral.

El individuo al que puede administrarse el medicamento puede ser un animal o un ser humano, preferentemente en el que el animal se selecciona entre un cerdo, un caballo, un perro, un gato o un ave (silvestre o domesticada).

En el caso de aves, ya sean silvestres o domésticas, el medicamento puede administrarse convenientemente por el tracto oral, por ejemplo incorporando el medicamento en agua potable o en el alimento. En el caso de una especie aviar, las especies domesticadas preferidas incluyen, por ejemplo, patos, gansos, pavos o gallinas, por ejemplo, pollos broiler.

El medicamento protege contra cualquier virus de la gripe A heterólogo, no sólo el tipo homólogo al virus ID clonado.

La pauta posológica puede consistir en una sola dosis de medicamento. Ventajosamente, la administración de la dosis puede programarse en el tiempo para permitir hasta 8 semanas aproximadamente antes de una posible infección con un virus de la gripe A. El periodo de profilaxis proporcionada por la invención puede estar en el intervalo de 0-6 semanas, 0-5 semanas, 0-4 semanas, 0-3 semanas, 0-2 semanas o 0-1 semana. Es posible un periodo extendido de hasta 12 semanas o más.

En un medicamento que requiere la administración simultánea, separada o en secuencia de al menos una cepa viva de gripe A, la cepa puede ser cualquier cepa de gripe A de ocurrencia natural. Por ejemplo, la cepa viva de gripe A puede seleccionarse entre H1N1, H2N2, H3N2, H3N8 o H5N1.

La cantidad de virus ID de la gripe A clonado en el medicamento está en el intervalo por dosis de 0,05-500 UHA, preferentemente un intervalo seleccionado entre 0,1-100, 0,5-50 ó 1-10 UHA. Otros intervalos posibles incluyen 0,05-10 UHA, 0,1-50 UHA y 1-100 UHA. Sin embargo, debido a la presencia de virus auxiliar, los valores de UHA medidos representan la suma de unidades HA para virus auxiliar y virus ID clonado.

La cantidad de virus ID de la gripe A clonado en el medicamento puede medirse mediante RT-PCR cuantitativa. Se emplean sondas y/o cebadores específicos para el segmento de ARN eliminado.

La cantidad de virus ID de la gripe A clonado en el medicamento puede ser del orden (por dosis) de 1 ng-1 µg de virus (medido en términos de proteína de virus total). La cantidad de virus ID puede estar en el intervalo de 0,05 µg-0,5 µg, opcionalmente 0,1 µg-0,5 µg. Las realizaciones preferidas incluyen de 0,01-0,1 µg o 0,01-1 µg de proteína de virus, más preferentemente 10 ng, 100 ng o 1 µg de proteína de virus. La cantidad de proteína de virus incluye virus auxiliar y virus ID clonado.

La cantidad de virus ID de la gripe A clonado, ya se mida en términos de UHA o µg de proteína de virus por dosis, puede modificarse de acuerdo con el sujeto. Por ejemplo, un caballo puede necesitar 4x la dosis humana, mientras que un ave puede requerir 1/10 de la dosis humana.

El ARN defectuoso en un virus ID de la gripe A clonado tiene al menos una deleción en comparación con el segmento genómico del que procede, aunque puede producirse una multiplicidad de partes eliminadas de segmento 1. Las deleciones pueden separarse por una multiplicidad de nucleótidos contiguos.

Los extremos 5' y 3' del segmento genómico que incluye la deleción están preferentemente intactos. En una realización más preferida el segmento es el segmento 1.

El efecto de la deleción es que el extremo 5' del segmento de virión ARN tiene al menos 150, 200 ó 220 nucleótidos.

Preferentemente el extremo 5' del segmento tiene un número de nucleótidos en el intervalo de 150-500, más preferentemente 150-250 ó 150-220.

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

La delección del segmento puede ser de al menos el 50% de los nucleótidos, preferentemente al menos 75%, más preferentemente al menos 80% de los nucleótidos. Para una delección eficaz en el segmento de ARN, puede eliminarse 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, 1.000, 1500, 3.000 ó 5.000 nucleótidos, preferentemente nucleótidos contiguos. Es posible una multiplicidad de delecciones dentro del mismo segmento de ARN.

La secuencia de nucleótidos de segmento genómico 1 de un virus ID de la gripe A clonado de acuerdo con la invención puede comprender:

- (a) una secuencia seleccionada entre SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, o
- (b) una secuencia de ácidos nucleicos de al menos el 99% de identidad con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

En otra realización preferida la secuencia tiene más del 99% de identidad con SEQ ID NO: 1.

La secuencia de nucleótidos del segmento genómico 1 puede comprender una inserción de uno o más nucleótidos en una o más posiciones en la secuencia de nucleótidos.

En una realización preferida, la secuencia de nucleótidos del segmento genómico 1 es SEQ ID NO: 1.

La invención proporciona por tanto una composición farmacéutica que comprende un virus ID clonado de la gripe A tal como se describe anteriormente.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención, adecuadas para su administración, comprenden el virus ID de la gripe A, opcionalmente virus auxiliar, en soluciones estériles acuosas o no acuosas, suspensiones y emulsiones. Las composiciones pueden comprender además agentes auxiliares o excipientes, tal como se conoce en la técnica, véanse, por ejemplo, Berkow y col., *The Merck Manual*, 16ª edición Merck & Co., Rahmān, NJ (1992), *Avery's Drug Treatment: Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 3ª edición, ADIS Press, Ltd., Williams and Wilkins, Baltimore, MD (1987) & Osol (ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, PA 1324-1341 (1980). La composición de la invención se presenta preferentemente 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 suspensión de liposomas incluyen emulsiones, suspensiones, soluciones, jarabes y elixires que contienen diluyentes inertes usados comúnmente en la técnica, por ejemplo, agua purificada. Además de diluyentes inertes, las composiciones de ejemplo pueden incluir también adyuvantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, o agentes edulcorantes, aromatizantes o de perfumes.

Cuando una composición o medicamento de la presente invención se usa para su administración a un individuo, puede comprender además sales, soluciones tampón u otras sustancias que son deseables para mejorar la eficacia de la composición.

Las composiciones o medicamentos preferidos son para administración mucosa. De las diversas opciones de administración mucosa disponibles, la vía intranasal es la más práctica ya que ofrece un acceso fácil con dispositivos relativamente sencillos que ya han sido producidos en masa. La composición de la invención está así adaptada y/o envasada preferentemente para administración intranasal, por ejemplo por spray nasal, gotas nasales, gel o polvo (véase Almeida & Alpar (1996) *J. Drug Targeting* & Agarwal & Mishra (1999) *Indian J. Exp. Biol.* 37:6-16).

Otras vías posibles para administración mucosa incluyen la oral, intragástrica, pulmonar e intestinal. La composición de la invención puede adaptarse y/o envasarse para administración mucosa (véase, por ejemplo, Walker (1994) *Vaccine* 12:387-400, Clements (1997) *Nature Biotech.* 15:622-623 & McGhee y col. (1992) *Vaccine* 10:75-88). Para

administración oral pueden proporcionarse comprimidos o cápsulas (opcionalmente de recubrimiento entérico). Opcionalmente, material líquido 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 & Newman, Plenum Press 1995).

5 Con independencia de la vía de suministro, las composiciones o medicamentos de la invención están preferentemente en forma de dosis 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 entre 0,1-0,5 ml, por ejemplo dos sprays de 100 µl, uno por orificio nasal.

10 Las composiciones de la invención son preferentemente estériles y preferentemente no pirógenas. A altas concentraciones, la composición de virus ID de la gripe A puede ser pirógena o mostrar actividad pirógena residual. Se introducen preferentemente en tampón, por ejemplo a entre pH 6,5 y pH 8, generalmente aproximadamente pH 7.

15 Se describe una forma ventajosa de administración nasal en el documento WO-2006/041.819 (Medimmune).

En consecuencia, la invención incluye un procedimiento para prevenir o tratar gripe A en un sujeto que comprende la administración de una cantidad eficaz de una partícula de virus ID de la gripe A clonado.

20 La partícula de virus ID de la gripe A clonado tiene preferentemente efecto antiviral en el sujeto. En otros aspectos, la administración de virus ID de la gripe A clonado proporciona preferentemente efecto protector inmediato contra una infección adquirida de gripe A.

25 De forma adicional o alternativa, el virus de la gripe A que infecta al sujeto es del mismo o diferente subtipo que la partícula de virus ID de la gripe A administrada.

La invención incluye también un procedimiento para convertir una cepa virulenta del virus de la gripe A que infecta a un sujeto en una infección vírica avirulenta, que comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un virus ID de la gripe A clonado.

30 La invención proporciona además un procedimiento para vacunar a un sujeto contra el virus de la gripe A que comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un virus ID de la gripe A clonado y una cantidad infectiva de un virus vivo de al menos una cepa de gripe A. El virus vivo actúa como un virus auxiliar.

35 La partícula de virus ID de la gripe A clonado y el virus vivo pueden administrarse por separado, simultáneamente o en secuencia.

40 La invención proporciona además un procedimiento para convertir una cepa virulenta del virus de la gripe A que infecta a un sujeto en una infección vírica avirulenta que vacuna al sujeto contra el virus infectante, que comprende la administración al sujeto un virus ID de la gripe A clonado.

El sujeto puede tener, o puede abrigarse la sospecha de que tiene, infección por un virus de la gripe A. En casos de infección real o incluso sospechada, el virus ID clonado puede administrarse lo antes posible, en un plazo de 48 horas, preferentemente en un plazo de 24 horas desde la infección o sospecha de infección del individuo. Análogamente, puede administrarse a los individuos el virus ID clonado como medida preventiva si acaban de exponerse al virus de la gripe A, ya sea por seres humanos, animales o aves infectados. En personas que tienen que trabajar con carcasas de animales o aves o con cadáveres humanos para los que se sabe o se sospecha una infección con gripe A puede administrarse el virus ID clonado de la invención. En dichas puede administrarse el medicamento de la invención de forma preventiva inmediatamente antes del riesgo de exposición al virus de la gripe A.

55 En cada uno de los procedimientos de la invención descritos anteriormente, el virus ID clonado es administrado en cantidad suficiente. El virus auxiliar puede ser de cualquier cepa de gripe A, ya sea de seres humanos o de otros animales, incluidas aves.

Se describe también una molécula de ácido nucleico que comprende:

(a) SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; o

- (b) Una secuencia de nucleótidos que tiene más del 96% de identidad con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; o
- (c) Una secuencia de nucleótidos que se hibrida con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 en condiciones restrictivas; o
- (d) Una secuencia de nucleótidos complementaria a cualquiera de las secuencias (a), (b) o (c).

5 La secuencia de nucleótidos puede tener más del 96,5, 97, 97,5, 98, 98,5, 99, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8 ó 99,9% de identidad con SEQ ID NO: 1.

Se describen también composiciones que comprenden una molécula de ácido nucleico tal como se define anteriormente.

10

El ácido nucleico es preferentemente ARN, aunque puede emplearse ADN durante procedimientos de manipulación genética.

También se describe un vector o plásmido que comprende un ácido nucleico tal como se describe en la presente memoria descriptiva. Los vectores pueden incluir un promotor ligado de forma operativa al ácido nucleico, opcionalmente una secuencia de terminación de transcripción. El ácido nucleico puede estar en la misma dirección o en dirección de sentido contrario con respecto al promotor.

15

Se ha encontrado que los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria descriptiva incorporados en partículas de virus de la gripe A muestran ventajosamente un efecto protector bastante superior contra la gripe A que otros virus ID clonados, por ejemplo 317/Vic o 220/PR8 (véase Duhaut & Dimmock, 2003, J. Virol. Methods 108:75 82). Los virus ID clonados preferidos de la invención muestran al menos 10 veces, más preferentemente al menos 100 veces de mayor actividad protectora contra la gripe A. En otras realizaciones preferidas la protección está en el intervalo de 8 a 500 veces, más preferentemente una protección de 50 a 250 veces.

20

El efecto protector puede establecerse *in vivo* en animales adecuados, por ejemplo, ratones, hurones, a partir de prueba de provocación letal con cualquier virus de la gripe A infeccioso.

El efecto protector puede ser el efecto profiláctico del virus ID clonado de la invención cuando se administra en solitario (sin virus auxiliar infeccioso) o puede incluir la coadministración con un virus auxiliar (que puede ser homólogo/heterólogo), posiblemente también de la misma cepa que el virus de provocación.

30

La invención incluye además una molécula de ácido nucleico de cebador o sonda que comprende al menos una parte de una secuencia de ácidos nucleicos tal como se describe en la presente memoria descriptiva.

35

Los procedimientos conocidos de vacunación contra la gripe dependen de la estimulación del sistema inmunitario del organismo, de manera que los glóbulos blancos producen anticuerpos que se fijan a la superficie del microbio e inician el proceso de su destrucción. Esto funciona para muchas enfermedades, tales como la viruela, la polio y el sarampión, pero es mucho menos eficaz con la gripe, ya que el recubrimiento del virus de la gripe está cambiando continuamente. La vacunación contra una cepa de gripe, por ejemplo H3N2, es totalmente ineficaz contra otras, tales como la H5N1. Esto resulta especialmente problemático cuando surge una nueva cepa pandémica, ya que es probable que todas las vacunas existentes sean totalmente ineficaces.

40

En un contexto médico y de salud pública, el virus ID de la presente invención puede conocerse también como "virus protector". El virus protector protege a los animales contra diversas cepas de gripe, y ofrece protección contra el conjunto completo de infecciones de gripe A, incluido H5N1 y cualquier nueva cepa pandémica o epidémica que infecte a los seres humanos. El virus protector proporciona protección instantánea, y protege por completo del desarrollo de los síntomas de la gripe al ralentizar las tasas de infección gripal en tal medida que la infección perjudicial se convierte en una vacuna contra esa misma forma de la gripe. También puede contrarrestar una infección real y ofrecer protección si se administra hasta 24 horas y más después de la primera infección.

45

50

En realizaciones preferidas de la invención, la delección específica de aproximadamente el 80% del ARN de una de las 8 cadenas de ARN del virus confiere una actividad protectora en el virus cuando se administra a seres humanos, animales o aves. El "virus protector" ofrece una protección instantánea contra la gripe y convierte las infecciones gripales en sus propias vacunas.

55

La delección hace el virus protector inocuo y evita que se reproduzca dentro de una célula, de manera que no puede diseminarse como un virus de la gripe normal. Sin embargo, si se une en la célula por otro virus de la gripe, conserva su naturaleza inocua pero empieza a reproducirse, y a mucha más velocidad que el nuevo virus de la gripe. Esta

rápida velocidad de reproducción, espoleada por la nueva infección gripal, significa que la nueva gripe invasora es desplazada eficazmente por el "virus protector". En consecuencia se ralentiza enormemente el proceso de la nueva infección, se evitan los síntomas gripales y se da tiempo al organismo para que desarrolle una respuesta inmunitaria al nuevo invasor nocivo. En la práctica, el virus protector convierte el virus virulento en una vacuna atenuada inocua.

5

El "virus protector" tiene el mismo efecto beneficioso, sea cual sea la cepa de gripe que infecta al individuo. Los resultados experimentales muestran esta ventaja. Por ello, el recubrimiento del virus es irrelevante para el proceso de protección: el efecto funciona en los genes del virus dentro de la célula. El virus protector constituye por tanto una herramienta altamente eficaz cuando se combate la diseminación de cualquier nueva cepa de virus, así como las cepas existentes. Podría suministrarse como una medida preventiva sin necesidad de adaptarlo a una cepa o mutación de la gripe en particular. Esto ofrece beneficios evidentes cuando se aborda el brote repentino de una gran epidemia, ya que no exige conocer la configuración exacta de la nueva cepa antes de desplegar el virus protector lo que lo hace mucho más útil que las vacunas, que son eficaces sólo contra cepas de virus existentes en particular.

10

15 Además, protege al instante, mientras que la protección generada por la vacunación convencional de la gripe necesita 2-3 semanas para ser completamente eficaz. Los experimentos muestran que puede suministrarse una sola dosis de virus protector 6 semanas antes de una infección con virus de la gripe y es eficaz. Esto ofrece una ventaja sustancial sobre los fármacos antivirales que sólo suministran una protección de menos de 24 horas. Otra ventaja es que el virus de la gripe no parece hacerse resistente al "virus protector".

20

El "virus protector" también protege cuando se suministra hasta 24 horas después de la infección y más allá. Así es capaz de contrarrestar una infección real. Por tanto, puede usarse también como tratamiento para contactos familiares y otros contactos directos de individuos infectados.

25

El "virus protector" es fácil de administrar ya que se dirige a las mismas células que cualquier otro virus de la gripe y usa el mismo procedimiento para entrar en la célula. Puede aplicarse simplemente una gota de suero salino que contiene el virus protector en la nariz. La administración en aerosol, usada ya para algunas vacunas, ofrece otra vía sencilla de administración.

30

El virus protector proporciona un tratamiento útil para animales domésticos. Los patos contraen una infección de aparato digestivo y los pollos una infección combinada del tracto digestivo y respiratorio. El virus protector puede suministrárseles simplemente en el agua potable. Una dosis puede proporcionar a un pollo, por ejemplo, al menos una semana de protección.

35

La gripe es un problema muy importante en la industria de los caballos de carreras y en los caballos domésticos. Muy recientemente se ha convertido también en un problema en los perros domésticos en los Estados Unidos y los gatos domésticos son susceptibles al virus H5N1.

Los virus ID clonados de la gripe administrados por vía intranasal (es decir, "virus protectores") proporcionan una actividad profiláctica excelente contra una potente prueba de provocación con el virus infeccioso en modelos de ratón y hurón, el segundo de los cuales emula con bastante cercanía una enfermedad humana. Hasta ahora, el mejor virus ID (244/PR8) es aproximadamente 50 veces más activo que cualquier virus ID no clonado (Noble y col., 2004 Vaccine 22: 3018-3025), y también protege a los ratones durante mucho más tiempo que el virus ID no clonado. Además, sólo el virus ID clonado tiene actividad terapéutica, probablemente como función de su mayor

45

actividad general.

Los diferentes virus ID clonados tienen distinta magnitud de actividad antiviral cuando se normalizan en UHA totales.

50

Los ARN defectuosos o el gen HA presente en virus infeccioso irradiado por UV o naturalmente no replicante persisten en células cultivadas (Cane y col. 1987, Virology 159: 259-264; Cane & Dimmock, 1990 Virology 175: 385-390), pero no se esperaba la persistencia de ARN "protector" de ID clonado *in vivo*. Según se cree, el ARN del virus de la gripe A no persiste generalmente en los animales inmunocompetentes.

55

Como la población de virus ID no clonado contiene una rica variedad de ARN defectuosos, no ha sido posible determinar un modo de acción molecular. Sin pretender estar limitados por ninguna teoría, los autores de la invención opina que una posibilidad es que la copia de un genoma de ARN es proporcional a su tamaño, de manera que un ARN protector que es 5 veces menor se replica 5 veces más deprisa. Así, partiendo de números iguales de genomas defectuosos e infecciosos en una célula, más del 90 y el 99% del genoma sería defectuoso después de 4 y 6 tandas de replicación, respectivamente. En estas condiciones, suponiendo que el empaquetamiento de ARN de la

gripe es un proceso organizado y que el ARN defectuoso y su contraparte de longitud completa están empaquetados con la misma eficacia, la mayoría de las partículas de la progenie contendrán un ARN defectuoso y no serán infecciosas. Además de esta reducción en la progenie infecciosa, los viriones defectuosos transmitirían ARN protector a células vecinas y las harían resistentes a la infección. El ARN defectuoso también puede competir con su contraparte no defectuosa para limitar las cantidades de constituyentes virales o celulares, inducir interferón alfa/beta o formar ARNip a partir de ARN defectuoso, aunque sobre esto último sólo se sabe que sucede en sistemas vegetales. De hecho, dichos mecanismos podrían trabajar conjuntamente.

Las concentraciones protectoras de virus protectores clonados y no clonados atenúan la infección por virus virulento en ratones y hurones. No existe enfermedad clínica, pero existen suficientes antígenos de virus virulento producidos para estimular una respuesta inmunitaria adaptativa que hace a esos animales inmunes a la reinfección con virus homólogos. De forma no intuitiva, la inmunidad era más débil después del tratamiento con la máxima concentración de virus protector, supuestamente debido a que se suprime la formación de antígenos a un nivel casi subinmunógeno.

El virus "protector" de ID clonado ofrece potencialmente una serie de ventajas con respecto a las vacunas o los fármacos existentes para combatir una gripe pandémica. El problema de las vacunas de la gripe es su exquisita especificidad para la cepa del virus del momento. Cuando aparece un nuevo virus, pueden necesitarse varios meses o un año para seleccionar una nueva cepa, producir y probar una vacuna, y distribuirla y administrarla a una parte importante de la población mundial. Una inmunidad completa inducida por la vacuna necesita aproximadamente 3 semanas para madurar, y los ancianos pueden no tener capacidad para montar una respuesta inmunitaria eficaz. En cambio, el virus protector ejerce su pleno efecto inmediatamente, y debería estar activo contra cualquier cepa de gripe A. Su actividad reside en el genoma viral, más que en el del hospedador, de manera que la protección también sería eficaz en los ancianos.

Una limitación importante de los fármacos antivirales es la rapidez con que se produce la resistencia, y ya se han aislado aislados de gripe humana resistentes al Tamiflu. Sin embargo, los ARN protectores dependen de la altamente conservada maquinaria de replicación del virus normal, con lo que es poco probable que aparezca resistencia.

Las dosis posteriores de ARN protector pueden suministrarse usando virus auxiliares diferentes antigénicamente. También será necesario seleccionar un virus auxiliar para el que la mayoría de la población humana no tenga inmunidad y que sea avirulento, tal como el virus A/PR8 (H1N1) usado por los autores de la invención.

A continuación se describirá en detalle la invención con referencia a ejemplos específicos y a dibujos en los que:

#### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

La Figura 1 muestra una secuencia de nucleótidos de 244/151PR8 (SEQ ID NO: 1) que es un ejemplo de un virus ID de la gripe A de la invención. La secuencia es la del ARN en sentido del virión.

La Figura 2 muestra una secuencia de nucleótidos de 244/151PR8 (SEQ ID NO: 2) que es un ejemplo de un virus ID de la gripe A preferido de la invención. La secuencia es la del ARN en sentido del virión.

La Figura 3 muestra el modo en que la transfección de células 293T con el plásmido de expresión de ARN de la gripe protector 244 y los plásmidos que expresan A/WSN infeccioso inhibe la producción de virus A/WSN.

La Figura 4 muestra la actividad profiláctica mediada por el virus protector 244/PR8 en ratones contra A/WSN infeccioso, monitorizada por enfermedad clínica y cambio en el peso corporal.

La Figura 5 muestra la duración de la actividad profiláctica del virus protector 244/PR8.

La Figura 6 muestra la longevidad de ARN 244 protector (395 nt) en pulmón de ratón en ausencia de virus infeccioso, tal como se muestra mediante RT-PCR con cebadores ARN1F y ARN1R.

#### **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

La mayoría de los virus ID de la gripe A tienen una única delección interna. En términos de nomenclatura, un ejemplo del ARN de virus ID clonado, descrito en la presente memoria descriptiva es:

ARN1\_244/151/395\_A/PR/8/34 (H1N1) x A/PR/8/34 (H1N1)

Así:

- 5 (a) El término inicial se refiere al hecho de que se obtiene del segmento 1 de ARN del virus A/PR8/34 (H1N1).  
 (b) El término siguiente indica que comprende 244 nt del extremo 5' y 151 nt del extremo 3' del ARN 1 tal como aparece en el virión, y que estos están enlazados conjuntamente para formar una nueva molécula de ARN continua de 395 nt.  
 10 (c) El término final se refiere al virus auxiliar, virus A/PR8/34.  
 (d) Su nombre abreviado es 244/151PR8.

Cuando no sea evidente lo contrario para un lector de competencias medias en la técnica, en los ejemplos específicos de los experimentos descritos a continuación se emplean los siguientes métodos y procedimientos:

15 **Preparación de virus ID clonado**

A continuación se describen los procedimientos usados en los ejemplos específicos y sujetos a variación se encontrarán también en los materiales y procedimientos descritos en Duhaut & Dimmock (2003), más arriba.

20 Se transfectaron células HEK293T usando procedimientos conocidos con el conjunto de plásmidos que es necesario para preparar virus A/PR8/34 infeccioso (H1N1).

A continuación se cultivaron las células transfectadas junto con células MDCK para amplificar el virus infeccioso. Se 25 recogió líquido del cultivo de tejidos que contenía el virus infeccioso y cualquier virus ID presente y, después de eliminar los desechos por centrifugación a baja velocidad, se almacenó a -70°C. La presencia de virus se demostró por aglutinación de glóbulos rojos de pollo (véase más adelante). Se registra la valoración de virus como unidades de hemaglutinación (UHA) de virus por ml.

30 A continuación se inyectó líquido de cultivo de tejidos (500 µl) en la cavidad alantoica de huevos de gallina embrionados de 10 días con el fin de impulsar la concentración de virus infeccioso y posible virus ID presente. Se incubaron los huevos durante 1 día a 33°C, y a continuación se enfriaron a 4°C durante toda la noche para matar el embrión. A continuación se recogieron los líquidos alantoicos de los huevos por procedimientos estándar.

35 La cantidad de virus se determinó por hemaglutinación. Se aclararon los líquidos alantoicos que contenían virus mediante centrifugación a baja velocidad, y se purificó (véase más adelante). Se repartió el virus en partes alícuotas y se almacenó en nitrógeno líquido o a -70°C a una concentración de  $2 \times 10^5$  UHA/ml.

Las pruebas preliminares (véase más adelante) mostraron que esta preparación protegía a los ratones de una 40 prueba de provocación intranasal letal de virus A/WSN de la gripe y por tanto que se había generado ARN de ID.

La RT-PCR con cebadores específicos del segmento 1 (véase más adelante) mostró que el ARN 1 de A/PR8/34 había dado lugar a ARN truncado. La secuenciación posterior demostró que había una especie de ARN truncada importante de 395 nucleótidos, y que era homóloga con ARN 1 de A/PR8/34. Este ARN se denomina 244/151PR8.

45 Se crearon virus que contenían ARN defectuosos de segmento 1 clonados 220 (H3N8) y 317 (H7N7) (Duhaut, S. D. & Dimmock, N. J. 1998, Virology 248: 241-253) por cotransfección de células 293T con plásmidos de ARN viral y defectuoso, y se cultivó junto con células MDCK. Se formó espontáneamente un tercer ARN defectuoso definido (244), también de segmento 1, después de la transfección de plásmidos de virus A/PR8 (véase la tabla 1a a 50 continuación).

La tabla 1a mostrada a continuación recoge la procedencia y la nomenclatura de ARN protectores de la gripe y sus virus auxiliares.

55 Tabla 1a

Abreviatura <sup>a</sup>	ARN defectuoso <sup>b</sup>	Virus auxiliar
220/PR8	ARN1_220/445_A/equino/Newmarket/7339/79 (H3N8)	A/PR/8/34 (H1N1)
220/Vic	Como anteriormente	A/Victoria/3/75 (H3N2)
317/Vic	ARN1_317/585_A/pollo/Dobson/27 (H7N7)	A/Victoria/3/75 (H3N2)

Abreviatura <sup>a</sup>	ARN defectuoso <sup>b</sup>	Virus auxiliar
244/PR8	ARN1_244/395_A/PR/8/34 (H1N1)	A/PR/8/34 (H1N1)
244/WSN	Como anteriormente	A/WS/33(N) (H1N1)
<sup>a</sup> 220, ARN protector; PR8, virus auxiliar. <sup>b</sup> Denota de izquierda a derecha: segmento de origen de ARN viral defectuoso, residuo de ruptura en el ARN de sentido menos, número total de nucleótidos, virus de origen.		

#### Eliminación de infectividad del virus auxiliar de la preparación de virus ID

Por definición, una reserva de virus ID contiene virus auxiliar infeccioso. La infectividad debe eliminarse antes de que se inocule al animal que se va a proteger. Así, el virus se coloca en un plato de plástico de manera que proceda de una capa de aproximadamente 1-2 mm y se irradia a temperatura ambiente con una dosis crítica (20 segundos) de luz UV. La irradiación UV se dirige a los ácidos nucleicos en proporción al tamaño, y rápidamente inactiva la infectividad de virus auxiliar. El ARN de virus ID (395 nt) y su actividad no se ven afectados significativamente ya que tiene un tamaño objeto de UV 34 veces menor que el del genoma infeccioso (13.600 nt). La dosis de UV requerida se determinó midiendo la tasa de inactivación de infectividad de virus A/PR8/34 en las mismas condiciones.

Después de inactivación por UV del virus auxiliar, la inoculación de células MDCK, huevos embrionados y ratones (por vía intranasal, seguido por cultivo de pulmones homogeneizados en huevos embrionados) no mostró infectividad residual (datos no mostrados). Una irradiación UV prolongada destruyó la actividad protectora del ratón del virus defectuoso (véase más adelante).

#### Purificación de virus ID

Se eliminaron los desechos presentes en el líquido alantoico por centrifugación a baja velocidad. A continuación se centrifugó el sobrenadante a alta velocidad sobre una capa de separador de aproximadamente 25 mm de sacarosa al 10%. Se recogieron las impurezas de baja densidad en la sacarosa y se sedimentó el virus en el fondo del tubo de centrifuga. Después de dejar que el sedimento se ablandara durante toda la noche, se volvió a suspender el virus a  $2 \times 10^5$  UHA/ml en PBS o PBS que contenía albúmina de suero bovino al 0,1% p/v. A continuación se dividió en partes alícuotas, y se almacenó congelado en nitrógeno líquido o a  $-70^\circ\text{C}$ . Todos los procedimientos se realizaron a  $4^\circ\text{C}$ .

#### Autenticidad del virus defectuoso pasado

Se confirmó la presencia del ARN defectuoso esperado en la reserva de virus purificada final (después de pasos de 1 célula y 2 huevos) por RT-PCR usando un cebador de terminal y un cebador específico para la secuencia de unión especial formada después de que tuviera lugar la delección central. Finalmente, los ARN se autenticaron por secuenciación. El análisis posterior del virus defectuoso 244/PR8 con cebadores específicos del segmento mostró que el 244 era el principal ARN presente.

#### 35 Ensayo de virus de la gripe por hemaglutinación

Este ensayo se basa en que la principal proteína presente en la superficie del virus, la hemaglutinina, se une a receptores virales en los glóbulos rojos del pollo y muchos virus pueden unirse a las células juntos y hacer que éstas se aglutinen. El ensayo es independiente de la infectividad y mide el virus de la gripe infeccioso y no gripe. El virus se diluye en serie 2 veces en pocillos en una bandeja de ensayo de plástico en diluyente salino, y se añade una décima dilución de glóbulos rojos de pollo. Después de un mezclado minucioso, se permite que los glóbulos rojos se asienten. Cuando no hay virus presente, los glóbulos rojos se asientan para formar un pequeño botón en la parte inferior del pocillo; cuando hay virus presente los glóbulos rojos se aglutinan y forman una capa fina uniforme sobre el fondo del pocillo. Se determina la valoración del virus por interpolación de la dilución, lo que proporciona una aglutinación del 50%. La ventaja del ensayo es su velocidad: los glóbulos rojos se asientan en aproximadamente 45 minutos. El ensayo se lleva a cabo normalmente a temperatura ambiente.

#### Protección de ratones de la gripe con ARN ID

50 Se inoculó a ratones (cepa C3H/He-mg; H-2k) por vía intranasal virus ID, que habían sido irradiados por UV durante 20 segundos para eliminar la infectividad del virus auxiliar infeccioso. La preparación de virus ID no era infecciosa cuando se inoculó limpia en huevos de pollo embrionados, y no se produjo ningún efecto observable en los ratones. Los ratones tenían de 4 a 5 semanas de vida y pesaban de 16 a 20 g. Se usaron los dos sexos pero se alojaron por

separado. Se igualaron los grupos de control en cuanto a sexo. Se anestesió ligeramente a los ratones con éter, y se dividieron los 40 µl de virus ID entre las dos narinas.

5 Todos los efectos de estimulación del sistema inmunitario o de bloqueo de receptores del virus ID se controlaron usando virus ID a los que se había irradiado por UV de forma prolongada durante 8 min. Se inactiva así la actividad ID, pero no afecta a las actividades de las proteínas hemaglutinina o neuraminidasa presentes en la superficie del virus.

10 Se usaron dos virus infecciosos de provocación. Estos virus se valoraron en ratones para determinar la dosis de cada uno que causaba una enfermedad respiratoria comparable.

Los inóculos en ratones comprendían normalmente:

- 15 (a) Virus ID no infeccioso activo, que contiene a veces una dosis definida de virus de provocación infeccioso de la gripe.  
(b) Virus ID inactivado por UV que contiene la misma dosis de virus de la gripe infeccioso.  
(c) Virus ID activo en solitario  
(d) Diluyente.

20 La morbilidad se valoró de acuerdo con la pérdida de peso, y por criterios clínicos. La pérdida de peso puede ser importante y suponer hasta más del 25% del peso inicial. La progresión de la enfermedad se define como:

- (a) Ratón sano  
(b) Signos clínicos de malestar, lo que incluye ligera piloerección, ligero cambio en la marcha y aumento de la  
25 ambulación  
(c) Signos clínicos de intensa piloerección, constricción de abdomen, cambios en la marcha, periodos de inactividad, aumento de la frecuencia respiratoria y a veces estertores  
(d) Signos clínicos como antes, pero más acusados; que muestran también baja actividad, y que terminan moribundos. Estos ratones se sacrifican cuando está claro que no sobrevivirán  
30 (e) Muerte.

Todos los virus sometidos a ensayo causan una enfermedad clínica similar. Además en la autopsia todos los virus causan una consolidación pulmonar similar.

35 Si bien la detección de cualquiera de los signos clínicos es una observación objetiva, el grado en el que se expresa es subjetivo. Sin embargo con experiencia incluso un ratón ligeramente enfermo es fácil de detectar. La escala de tiempo de la gripe letal depende de la dosis vírica aunque normalmente los signos clínicos comienzan en un lapso de 3-5 días y avanzan hasta el desenlace mortal en otros 2-4 días. El curso clínico de una enfermedad no letal será más largo. Existen diferencias de virulencia entre los virus de las cepas de la gripe (es decir, la cantidad de virus  
40 infeccioso necesario para provocar la enfermedad), aunque todos tienen una manifestación clínica similar. Las cepas endogámicas de ratón difieren en su susceptibilidad (es decir, la cantidad de virus infeccioso necesaria para provocar la enfermedad), pero en los datos limitados el patrón de enfermedad es similar. Los ratones C3H/He-mg son una cepa susceptible preferida que produce una enfermedad reproducible en la mayoría de los animales  
45 inoculados.

Los ratones también se pesan como una medida objetiva de la enfermedad. Los ratones se usan a las 4-5 semanas de vida (16-20 g) cuando todavía están ganando peso. Un ratón gana aproximadamente 500 mg/día. Cuando la infección avanza los ratones dejan de ganar peso y a continuación empiezan a perder peso. Esto sucede  
50 aproximadamente un día antes de que muestren signos de malestar (como en 1b anterior). Los ratones se pesan en un grupo que comprende normalmente 5 ratones o más. Así una pérdida de aproximadamente 2 g (400 mg/ratón) es fácil de detectar. Los ratones pueden perder hasta el 25% del peso corporal total antes de morir/ser eliminados, es decir, un ratón de 20 g podría perder 5 g.

#### 55 **Protocolo RT-PCR**

Se extrajo ARN del virus con reactivo de Trizol (Invitrogen), y se disolvió en 100 µl de agua. Alternativamente se extrajo ARN de los pulmones de un ratón triturándolos con arena estéril en 4 ml de Trizol. Partes alícuotas de 5 µl de ARN total (o ARN de 200 µl de virus) se sometieron a transcripción inversa en 20 µl de reacciones durante 1 h a 42°C, usando un cebador específico de ARN 1 de la gripe de tipo A genérico (ARN1F:

5'AGCGAAAGCAGGTCAAATATA3'), complementario en el extremo 3' del ARNv. El ARN 1 codifica el componente de proteína PB2 de la replicasa vírica. Las partes alícuotas (1,5 µl) de la reacción de transcripción inversa fueron amplificadas por PCR usando ADN polimerasa *Taq* (MBI Fermentas o New England Biolabs) y cebadores genéricos 5 específicos para ARN 1 de virus de la gripe A, ARN1F y ARN1R (5'AGTAGAAACAAGGTCGTTTTTA3', complementario en el extremo 3' del ARNc o un cebador específico para la secuencia de unión en el ARNi 244, 244J (5'ATCCCCTCAGTCTTCTCCTG3') en un volumen de reacción de 25 µl. ARN1F tiene una única falta de correspondencia con la secuencia PR8 publicada mientras que ARN1R es idéntico a la secuencia PR8 publicada. La PCR consistió en 30 ciclos de 94°C durante 20 s, 50°C durante 30 s y 72°C durante 10 30 s. Las partes alícuotas de 10 µl se analizaron por electroforesis en gel de agarosa.

#### Verificación de que la actividad protectora en el ratón reside en ARN 244

Dado que existían cantidades traza de otros ARN defectuosos, era importante verificar que la actividad antiviral de 15 244/PR8 en ratones residía en el ARN 244, y no en una combinación de 244 y otro ARN defectuoso. Para este fin, se transfectó ARN 244 clonado en un plásmido de expresión junto con plásmidos que codifican A/WSN infeccioso. En una atracción en paralelo, el virus 244/WSN defectuoso resultante tenía la misma actividad protectora que 244/PR8 (protección completa con 100 ng por ratón y al menos 10 veces más que otros virus defectuosos, véase la 20 tabla 15 mostrada más adelante) lo que confirmaba que ARN 244 era el responsable de la profilaxis (datos no mostrados). Esto demuestra también la facilidad con la que puede transferirse un ARN defectuoso a un nuevo virus auxiliar.

#### Virus defectuosos definidos protegen profilácticamente a los ratones contra el virus de la gripe infeccioso

25 Se inoculó a los ratones por vía intranasal con virus defectuoso o con virus defectuoso que había sido irradiado por UV para destruir su actividad potencial de protección. El segundo conserva actividades completas de H y N y sirve como control de inmunogenicidad y bloqueo de receptores celulares. En los primeros experimentos, se inoculó en ratones simultáneamente una sola dosis de virus protector (400 UHA) y A/WSN infeccioso patógeno para ratones.

30 La figura 4 muestra la actividad profiláctica mediada por el virus protector 244/PR8 en ratones contra A/WSN infeccioso, con seguimiento por enfermedad clínica y cambio del peso corporal. Los ratones recibieron 400 (a, b, c), 40 (d, e, f), y 4 UHA (g, h, i) de virus protector 244/PR8 simultáneamente con 10 DL<sub>50</sub> de A/WSN. La figura muestra las puntuaciones clínicas (a, d, g) y los cambios de peso (b, e, h). Entre paréntesis se muestra el porcentaje de supervivencia. Los símbolos denotan los inóculos suministrados en los paneles a, d, g: ■, virus protector inactivado 35 + 10 DL<sub>50</sub> de A/WSN; ▲, virus protector + 10 DL<sub>50</sub> de A/WSN; ●, diluyente. Los paneles c, f, i muestran el resultado de los ratones supervivientes a la prueba de provocación con 10.000 DL<sub>50</sub> de A/WSN, 3 semanas después de la primera infección. Dado que la dosis más elevada de virus protector no proporciona protección contra esta dosis elevada de A/WSN (no mostrado), esto prueba el desarrollo de inmunidad adaptativa.

40 Los ratones que recibieron virus protector inactivado por UV más A/WSN sufrieron pérdida de peso y enfermedad clínica, y todos murieron (fig. 4a, b). Este resultado fue idéntico al de la enfermedad en ratones que recibieron virus infeccioso en solitario (datos no mostrados). En comparación, los ratones que recibieron virus protector más A/WSN siguieron ganando peso al igual que los animales de control infectados con placebo y no mostraron signos de enfermedad (fig. 4a, b). Una dilución de 10 veces del virus protector (para 40 UHA/ratón) mantuvo controlada la 45 enfermedad clínica importante y la muerte, aunque se produjo una ligera pérdida de peso transitoria y cierto malestar, que se resolvió en el día 10 (fig. 4d, e). Finalmente, 4 UHA de virus protector por ratón ralentizaron el inicio de los signos clínicos y la pérdida de peso y aumentaron la supervivencia del 0 al 60% (fig. 4g, h).

La misma dosis mínima (40 UHA/ratón) de 244/PR8 proporcionó una sólida protección contra la prueba de 50 provocación con virus infeccioso con 4 preparaciones independientes, lo que da fe de la reproducibilidad de la producción y de la acción del virus protector. Esta dosis era equivalente a 100 ng de proteína de virus o 400 x 10<sup>6</sup> partículas de virus por ratón. Todas las preparaciones proporcionaron también una protección importante con 10 ng de virus protector. Otros tres virus protectores que contenían uno u otro de 2 ARN protectores de segmento 1 definidos diferentes, que se produjeron, normalizaron en UHA y probaron exactamente de la misma forma, fueron de 55 10 a 100 veces menos activos que 244/PR8 (véase la tabla 15 más adelante). Estos tenían la misma capacidad relativa de protección contra A/PR8, lo que mostraba que las diferencias no eran específicas del virus de provocación (datos no mostrados). Es necesaria la cuantificación por RT-PCR del número de moléculas de ARN protectoras en cada preparación para determinar si existe de hecho variación en la actividad intrínseca de los ARN protectores, o en la eficacia con la que se replican o empaquetan mediante virus auxiliares determinados. La

variación de 10 veces en la actividad protectora de ARN 220 en el contexto de virus auxiliares A/PR8 o A/Vic puede indicar la importancia de esta interacción (véase la tabla 15 más adelante). Finalmente, la dosis más alta de 244/PR8 previno completamente la enfermedad clínica causada por una dosis diez veces mayor de prueba de provocación con A/WSN (100 DL<sub>50</sub>), y convirtió 1.000 DL<sub>50</sub> de A/WSN en una enfermedad transitoria con signos clínicos leves (datos no mostrados).

#### **Duración de la protección profiláctica ejercida por el virus protector**

La figura 5 muestra la duración de la actividad profiláctica del virus protector 244/PR8. Se administró una sola dosis de virus protector (a, b) o virus protector inactivado (c, d) (4.000 UHA/10 µg) por vía intranasal 42 días (6 semanas) antes de la infección: ■, virus protector inactivado; A, virus protector. Se sometió a los ratones a prueba de provocación con 10 DL<sub>50</sub> de A/WSN en el día 0 (flecha). Los ratones fueron monitorizados en cuanto a cambio de peso (a, c) y puntuaciones clínicas totalizadas (b, d).

Una sola dosis de virus protector o virus protector inactivado (4.000 UHA) no tiene efectos perjudiciales y los animales permanecen completamente sanos y ganan peso exactamente como los controles inoculados con placebo (fig. 5a, c). Se sometió a los ratones a prueba de provocación por vía intranasal con virus infeccioso 1 a 42 días (6 semanas) después de recibir el virus protector. La fig. 5 muestra datos para el grupo de 6 semanas. Los ratones que habían recibido el virus protector estaban completamente protegidos (fig. 5c, d), mientras que los que recibieron virus protector inactivado sucumbieron a la infección (fig. 5a, b).

La incapacidad del virus protector inactivado de prevenir la enfermedad mostró que los ratones no habían montado una respuesta inmunitaria adaptativa a los antígenos del virus de la gripe, y sugirió que los del ARN protector persistían en el aparato respiratorio murino. Se probó con RT-PCR usando ARN extraído de los pulmones de ratones a los que se había inoculado sólo virus protector.

La figura 6 muestra la longevidad del ARN 244 protector (395 nt) en pulmón de ratón en ausencia de virus infeccioso, como se demuestra por RT-PCR con cebadores ARN SI y ARN1R. Calle 1, marcadores de tamaño de ADN (pb); calles 2-6 amplicones de pulmones de ratón. El ARN para las calles 2-5 se extrajo 1 día, 9 días, 21 días y 42 días respectivamente después de inoculación con 4.000 UHA de virus protector; calle 6, inoculación de placebo.

La RT-PCR muestra que el ARN protector permanece, y parece disminuir con el tiempo (fig. 6). Se detectó durante hasta 21 días después de la inoculación, lo que sugería que el ARN protector era responsable de preparar ratones refractarios a gripe clínica. Los ratones a los que se suministró una dilución de 10 veces virus protector (400 UHA) estaban completamente protegidos de prueba de provocación 7 días después, pero no 14 días después (datos no mostrados).

#### **La profilaxis se extiende a diferentes subtipos de virus de la gripe A**

Uno de los problemas de combatir la gripe es que pueden existir 144 subtipos distintos de virus A, así como la progresiva variación de deriva que todos experimentan en los seres humanos, y cada subtipo y variante de deriva importante requiere su propia vacuna. Sin embargo, el virus protector 244/PR8 administrado por vía intranasal protegía a los ratones de la enfermedad clínica causada por cepas humanas de H3N2 (A/England/939/69 x A/PR/8/34), H2N2 (A/Jap/305/57) y los virus H1N1 antigénicamente distintos (A/PR/8/34 y A/WS/33(N)) y la cepa equina H3N8 (A/Newmarket/7339/79) (datos no mostrados). Así el virus protector facilita una amplia protección cuya dosis no parece estar limitada por los antígenos de superficie de H y N.

#### **El virus protector tiene beneficio terapéutico**

Los trabajos anteriores con virus interferente no clonado no mostraron efecto terapéutico, pero debido a la fuerte acción profiláctica del virus protector definido se revisó este experimento. Se infectó a los ratones con 10 DL<sub>50</sub> de A/WSN como antes, y se trató por vía intranasal 24 y 48 h posteriormente con una sola dosis de virus protector o virus protector de control inactivado (4.000 UHA). Mientras todos los ratones de control murieron, la terapia con virus protector a las 24 h evitó completamente la enfermedad clínica, la pérdida de peso y la muerte; a las 48 h todos los ratones cayeron enfermos aunque la enfermedad se retrasó, y el 33% se recuperaron (tabla 1b mostrada a continuación). Al aumentar la dosis infecciosa se reducía la eficacia terapéutica.

La tabla 1b muestra el beneficio terapéutico del virus protector en ratones <sup>a</sup>

Tabla 1b

Terapia	Virus protector inactivado		Virus protector	
	Enfermos	Recuperados	Enfermos	Recuperados
24 h p.i.	100% (en día 5)	0% (murieron días 5-7)	0%	100%
48 h p.i.	100% (en día 5)	0% (murieron días 5+7)	100% (durante días 6-16)	33%

<sup>a</sup> Infectados con 10 DL<sub>50</sub> de A/WSN y tratados post-infección (p.i.) en los momentos mostrados con virus protector inactivado o virus protector (4.000 UHA/10 µg de proteína de virus). Todas las inoculaciones fueron intranasales con ligera anestesia. Se usaron grupos de 5-7 ratones; este experimento es representativo de 3 experimentos independientes.

Los ejemplos siguientes proporcionan un detalle más específico de experimentos en los que interviene el virus ID clonado de la invención.

5

#### **EJEMPLO 1- Producción de virus ID clonado 220/PR8**

El trabajo anterior conocido en la técnica enseña que la producción de virus ID es óptima cuando se inoculan huevos embrionados de gallina con grandes cantidades de inóculo (por ejemplo, hasta 2 ml por huevo). La explicación suministrada es que las células en las que reside el virus ID no infeccioso también necesitan recibir virus (auxiliar) infeccioso, de manera que el primero pueda replicarse. Además, la cantidad de virus ID presente normalmente aumenta cuando se repite el paso una segunda o una tercera vez. Eventualmente, la cantidad de virus ID generada es superior a la cantidad de virus infeccioso presente, existe falta de función del virus auxiliar y la producción total de virus disminuye.

15

Inesperadamente, el autor de la invención encontró que la inoculación de huevos de pollo embrionados con cantidades rutinarias, es decir, estándar de virus ID de la gripe A clonado no consigue producir las cantidades esperadas de material de virus ID; hasta tal punto de que es un impedimento para estudios de laboratorio adicionales, lo que incluye estudios con animales *in vivo*; y mucho más para ensayos clínicos o para la producción de preparaciones de virus ID para fabricación de composiciones farmacéuticamente aceptables o vacunas.

20

Sorprendentemente, el autor de la invención encontró que incluso un solo paso de 100 µl de inóculo de un virus ID clonado en huevos de gallina embrionados durante 48 h a 33°C produjo un rendimiento razonablemente alto de virus ID. En particular, el virus ID 244/151PR8 produjo un rendimiento muy alto de virus (mostrado por hemaglutinación) cuando se usaron sólo 100 µl de inóculo.

25

El autor de la invención también encontró que al diluir el inóculo 1/10, un solo paso de 100 µl del mismo en la cavidad alantoica de huevos de gallina embrionados de 10 días produjo un incremento de virus total de aproximadamente 10 veces (mostrado por hemaglutinación). Un aumento en el rendimiento de virus protector alcanzado por dilución de la preparación del virus antes del paso en huevos de gallina embrionados era totalmente inesperado.

30

Además, cuando los virus pasados obtenidos en alto rendimiento a partir del inóculo diluido se purificaron y concentraron, se encontró que esta preparación de virus protegía a los ratones de una prueba de provocación intranasal letal de virus de la gripe A/WSN. Esto demostró que la preparación de virus pasada contenía ARN ID.

35

Un problema identificado por el autor de la invención era por tanto cómo amplificar el virus ID clonado potencial a la vez que se mantenía un alto (suficiente) rendimiento del virus.

40 El procedimiento empleado fue:

1. Los plásmidos necesarios para producir virus auxiliar infeccioso de la gripe más el plásmido que codifica ARN 220 (62,5 ng) se transfectoron en células HEK293T. Aunque las células HEK293T son útiles para transfección no lo son para aumentar las cantidades de virus clonado.

45

2. Las células 293T transfectadas se pusieron a continuación en cultivo junto con células de riñón canino (MDCK) Madin-Derby. Se eliminaron los líquidos de cultivo de tejidos después de 2 días de incubación, se sometieron a prueba en términos de actividad de hemaglutinación vírica, y se congelaron a -70°C. Aunque las células MDCK son difíciles de transfección, son bastante adecuadas para cultivar virus de la gripe.

50

3. Se inyectó el líquido de cultivo de tejidos de las células MDCK (500 µl/huevo) en la cavidad alantoica de huevos de gallina fértiles para reforzar la valoración del virus (Paso (P) 0). Se incubaron los huevos a 33°C durante 24 h, y a

continuación se enfriaron a 4°C para matar el embrión. A continuación se eliminó el líquido alantoico (que contenía virus) del huevo, y se probó la actividad HA.

4. Se pasó en serie el virus en huevos (P1-3) usando 200 µl de inóculos e incubación de 24 h.

5 La tabla 1c mostrada a continuación indica el rendimiento del virus ID clonado 220/PR8 en función del número de paso

Tabla 1c

Número de experimento	Hospedador y número de paso (P)	Inóculo (número de experimento)	Volumen de inóculo (µl)	Producción de virus (UHA/ml)
774H(i)	células 293T (transfección)	Plásmidos	No aplicable	32
774H(ii)	Huevo - P0	774H(i)	500	9.600*
778	Huevo - P1	774H(ii)	200	8.000
779	Huevo - P2	778	200	800
788	Huevo - P2	778	200	1.600
780	Huevo - P3	779	200	400

UHA, unidades de hemaglutinación.  
 \* La producción de PR8 fue  $\geq 19.200$  UHA/ml.  
 Obsérvese que las valoraciones de HA no se realizaron al mismo tiempo y que pueden aparecer pequeñas variaciones en la valoración dependiendo de la edad de los glóbulos rojos.

10 Se usó una alta valoración de virus/gran volumen de inóculo en huevos durante aproximadamente 3 pasos. (Véase P1 a P3 en tabla 1a) La valoración obtenida en P1 era comparable (en realidad aproximadamente 2,4 veces menor) a la debida a un virus natural. Las valoraciones obtenidas en P2 (dos experimentos) y P3 fueron de 12 a 50 veces menores que el virus natural, es decir, no había virus suficientes para su uso.

15 La tabla 2 mostrada a continuación indica la producción de virus ID clonado 220/PR8 en función del volumen de inóculo

Tabla 2

Número de experimento	Hospedador y número de paso (P)	Inóculo (número de experimento)	Volumen de inóculo (µl)	Producción de virus (UHA/ml)	Actividad de ID*
778	Huevo - P1	774H(ii)	200	8.000	No realizado
794	Huevo - P1	774H(ii)	10	4800	++++
802	Huevo - P1	774H(ii)	1	4800	No realizado
800	Huevo - P1	774H(ii)	0,1	5.000	No realizado

\*En ratones de prueba de provocación letal con A/WSN

20 La reducción del volumen de inóculo tuvo un escaso efecto en la producción total de virus, pero 10 µl de inóculo parece económico y practicable.

La figura 3 muestra los resultados de un experimento en el que se transfectaron varias cantidades de plásmido 244 en células 293T junto con una cantidad constante de plásmidos que codifican A/WSN infeccioso. Un día después se cultivaron estas células junto con células MDCK durante 7 días. Se midió la producción de virus (UHA) en el líquido de cultivo. La producción de virus demostró ser sensible a la cantidad de plásmido de expresión de ADN defectuoso transfectado y a la cantidad de virus pasados en huevos de pollo embrionados (datos no mostrados). Se obtienen mejores producciones de virus inoculando menos plásmido de ARN defectuoso, o pasando cantidades menores de virus en los huevos embrionados.

30 Pasos sucesivos en huevos produjeron un virus seminal y la reserva de virus final, respectivamente.

Después de purificación por centrifugación diferencial, se normalizaron los virus defectuosos a  $2 \times 10^5$  unidades de hemaglutinación (UHA)/ml.

35 **EJEMPLO 2 - Generación de virus protector 244/PR8.**

El principal ARN protector usado (segmento 1; ARN244) apareció espontáneamente durante la

transfección/cocultivo de plásmidos que codifican A/PR/8/34 infeccioso (Subbarao, K. y col. 2003 Virology 305: 192-200). La mezcla de ADN transfectada en células 293T contenía 0,5 µg de cada uno del segmento génico 8 A/PR8 (con promotores Poll), 0,5 µg de cada uno de los plásmidos de expresión PB1 y PB2, 0,1 µg de plásmido de expresión PA y 1 µg de plásmido de expresión NP, y Eugene (Roche).

5

Con el fin de optimizar la transfección del plásmido de ARNi 244, se clonó el ARN 244 en el plásmido de expresión Poll pPOLI-SapIT (Subbarao (2003) más arriba), de manera que se expresó un transcrito de sentido ARNv. Se transfectaron cantidades variables del plásmido 244 (0-0,5 µg) en células 293T tal como se describe anteriormente. Después de 24 h, se sometieron las células 293T a tripsinización, se mezclaron con células MDCK y se resembraron en placa. Después de 7 días de cultivo se recogieron los sobrenadantes, y se determinó la producción de virus por ensayo HA.

En otro experimento se usaron plásmidos de codificación A/WSN (Neumann, G. y col. 1999 Proc. Natl. Acad. Sci. 96: 9345-9350). Después de 24 h, las células 293T se sometieron a tripsinización, se mezclaron con células MDCK y se resembraron en placa, y se recogieron los sobrenadantes del cultivo 7 días más tarde. El crecimiento de virus se determinó por ensayo HA. Se hizo pasar dos veces en huevos de pollo embrionados para preparar una reserva de semillas, y después una reserva de trabajo para estudios con ratones. Se purificó el virus por centrifugación diferencial a través de sacarosa. Se volvieron a poner en suspensión las reservas en PBS que contenía el 0,1% p/v de albúmina de suero bovino, se normalizó por valoración HA y se guardó en nitrógeno líquido. La RT-PCR y la secuenciación de ARN extraído de virus purificado mostraron que el ARN 244 se obtuvo por una única delección central de aproximadamente el 80% del segmento 1. El ARN es 395 nt, que comprende nt 1-244 y 1891-2041 (del ARN de sentido negativo). Así conserva los extremos exactos y las secuencias terminales que contienen las señales de replicación y encapsidación. El análisis con cebadores específicos para cada segmento de genoma mostró que el ARN 244 era el único ARN defectuoso importante presente. El ARN 244 conservó su secuencia en el paso y no fue sustituido ni aumentado por cantidades importantes de otros ARN defectuosos.

Los virus protectores A/PR8 o A/Victoria/3/75 (A/Vic; H3N2) que contienen ARN 220 ó 317 (Duhaut, S. D. & Dimmock, N. J. 2003, Journal of Virological Methods 108: 75-82) se produjeron de la misma forma. Se requería una optimización de la cantidad de plásmido de ARN defectuoso durante la transfección (véase más adelante) y del inóculo del huevo con el fin de evitar bajas producciones de virus protector. Se produjeron reservas de virus infeccioso de otros virus de la gripe A por infección de baja multiplicidad (aproximadamente  $10^4$  DIH<sub>50</sub>).

### **EJEMPLO 3 - Producción de virus ID clonado 244/151PR8**

Se inyectó líquido alantoico (10 µl/huevo) en la cavidad alantoica de huevos de gallina fértiles para preparar una reserva de virus ID. Se incubaron los huevos a 33°C durante 48 h, y a continuación se enfriaron a 4°C para matar el embrión. A continuación se eliminó el líquido alantoico, y se probó la actividad de HA. Se purificó el virus por centrifugación diferencial a 4°C. La eliminación de los desechos grandes se realizó por centrifugación a 'baja velocidad' (3.000 rpm durante 10 min en el rotor de cabezal oscilante de una centrifuga Beckman GS-6R). Se siguió de sedimentación del virus a 26.000 rpm g durante 2 h en un rotor Beckman SW28 a través de un amortiguador de 5 ml de sacarosa (10% p/v en suero salino con tampón Tris pH 7,4) para separar el virus de contaminantes más pequeños. El material que contiene lípidos de baja densidad (por ejemplo, yema de huevo) se mantiene en la sacarosa. A continuación se valoró la HA del virus y se ajustó a  $2 \times 10^5$  UHA/ml. Se almacenó en partes alícuotas en nitrógeno líquido o a -70°C.

45

La tabla 3 mostrada a continuación recoge los resultados para la producción de virus ID clonado 244/151PR8.

Tabla 3

Número de experimento	Hospedador	Inóculo	Volumen de inóculo (μl)	Producción de virus (UHA/ml)	Actividad de ID*
781	Células 293T (transfección)	Plásmidos	No aplicable	512	No realizado
783	P0 – huevo	781	200	?	No realizado
793	P1 – huevo	783	10	3200	++++
797	P1 – huevo	783	10	3800	++++

P0, paso cero.  
\*En ratones de prueba de provocación letal con A/WSN; fueron +++ protectores a 1/100. Así, la actividad de ID se obtuvo de forma reproducible en el paso de huevo.

#### **EJEMPLO 4 - Valoración de la actividad de ID 244/151PR8 en ratones**

5

Se determinaron las valoraciones de infectividad tal como se requería mediante valoración en cultivo celular, huevos y ratones. Se sometieron los virus a ensayo en placa en células MDCK en agar por procedimientos estándar. Se inoculó en los huevos virus diluido al límite y se incubó durante 3 días. Se identificaron los huevos positivos a los virus por HA en líquido alantoico. Se inoculó en los ratones tal como se describe más adelante, a continuación 3 días más tarde se sacrificó a los ratones, y se inoculó en los huevos pulmones triturados de ratones individuales, y se determinó la presencia de virus por HA. Alternativamente se sometió a los ratones a prueba de provocación por vía intranasal después de 3 semanas con virus homólogos para determinar si la infección subclínica había estimulado inmunidad protectora. Se calcularon las valoraciones de infectividad en criterios de valoración en huevos y ratones de acuerdo con Spearman-Kärber (Karber, G. en Textbook of Virology (eds. Rhodes, A. J. & van Rooyen, C. E). 118 (Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1968)).

10

15

Se inoculó en ratones C3H/He-mg (H-2k) adultos (4 semanas de vida; 16-20 g) por vía intranasal con ligera anestesia con éter tal como se describió anteriormente (Noble y col., 2004 Vaccine 22: 3018-3025) con 40 μl de inóculo divididos entre las dos narinas. La infectividad del virus auxiliar puede eliminarse sin reducir la protección por una breve ráfaga (20 s) de irradiación UV a 253,7 nm debido a la diferencia en los tamaños de diana UV: 13.600 nt para infectividad y 395 nt para el ARN protector. La lámpara se calibró inactivando la infectividad de A/PR8. Una irradiación UV más larga (8 minutos) inactiva la protección y proporciona una preparación que controlaba los efectos de estimulación del sistema inmunitario o el bloqueo de receptores. La irradiación no afectó a las actividades de H o N. Se suministraron a los ratones varias combinaciones de virus protector no infeccioso, virus protector inactivado, virus de provocación infeccioso o diluyente. Se valoraron los virus de provocación infecciosos en ratones para determinar una dosis para cada uno que provocara una enfermedad respiratoria comparable. Se infectó a los ratones con 10 DL<sub>50</sub> (100 DI<sub>50</sub>) de A/WSN según se determinó por inmunización por la vía intranasal. Se evaluó la salud de los ratones según la pérdida de peso, y por criterios clínicos descritos anteriormente (Noble, S. & Dimmock, N. J., 1994 Journal of General Virology 75: 3485-3491). Se pesó a los ratones como un grupo. Los criterios clínicos se puntuaron del modo siguiente: 1 punto para cada ratón sano; 2 puntos para un ratón que mostrara signos de malestar, como piloerección, ligero cambio en la marcha y aumento de la ambulación; 3 puntos para un ratón que mostrara signos de piloerección intensa, constricción abdominal, cambios en la marcha, periodos de inactividad, aumento de la frecuencia respiratoria y a veces estertores; 4 puntos para un ratón con características reforzadas del grupo anterior, pero con baja actividad, y que estuviera moribundo; dichos ratones se sacrificaban cuando estaba claro que no sobrevivirían; y 5 puntos para un ratón muerto. Para permitir una comparación, se dividió la puntuación clínica total por el número de ratones en el grupo experimental. Todos los virus causaron una enfermedad clínica similar, lo que incluía consolidación pulmonar. Los experimentos siguieron las directrices del UK Coordinating Committee for Cancer Research.

#### **40 Experimento 1 - Protección de ratones de A/WSN letal por 400 UHA de virus ID**

La tabla 4 mostrada a continuación recoge los resultados para ratones a los que se inoculó por vía intranasal 400 UHA (aproximadamente 1 μg de proteína de virus) de virus ID inactivados por UV mezclados con virus A/WSN de provocación o con virus ID mezclados con virus A/WSN de provocación. También se inoculó a los ratones virus ID en solitario. A los ratones se les inoculó después de anestesia ligera con éter.

45

Tabla 4

Día	VIDi+ virus <sup>a</sup>			VID+ virus <sup>a</sup>			VID en solitario <sup>b</sup>		
	Peso	Enfermos	Muertos	Peso	Enfermos	Muertos	Peso	Enfermos	Muertos
0	107	0	0	115	0	0	49	0	0
1	108	0	0	116	0	0	52	0	0
2	109	0	0	117	0	0	48	0	0
3	110	0	0	119	0	0	50	0	0
4	106	3	0	119	0	0	50	0	0
5	102	5	0	121	0	0	51	0	0
6	94	5	0	124	0	0	53	0	0
7	86	1	4	122	0	0	52	0	0
8	17	1		125	0	0	53	0	0
9	17	1		127	0	0	54	0	0
10	17	1		129	0	0	55	0	0

VIDi = virus ID inactivados por UV;  
 VID = virus ID.  
<sup>a</sup> 5 ratones/grupo; <sup>b</sup> 2 ratones/grupo

Todos los ratones que recibieron virus ID inactivado más virus de provocación perdieron peso y enfermaron; el 80% murió. Todos los ratones que recibieron virus ID más virus de provocación se mantuvieron clínicamente normales.

5 Ganaron peso todos los días, excepto a partir del día 7.

**Experimento 2 - Prueba de provocación de todos los ratones que sobrevivieron 3 semanas después de inoculación con dosis elevada de A/WSN (aproximadamente 1.000 DL<sub>50</sub>)**

10 La tabla 5 mostrada a continuación recoge el resultado de tomar los supervivientes de 3 semanas del Experimento 1 anterior y someterles a una prueba de provocación con una dosis elevada de A/WSN.

Tabla 5

Día	VIDi+ virus			VID+ virus <sup>a</sup>			VID en solitario <sup>b</sup>		
	Peso	Enfermos	Muertos	Peso	Enfermos	Muertos	Peso	Enfermos	Muertos
0	n/d			163	0	0	65	0	0
1				165	0	0	66	0	0
2				166	0	0	63	0	0
3				166	0	0	58	2	0
4				169	0	0	55	2	0
5				170	0	0	53	2	2
6				169	0	0	50		2
7				171	0	0			
8				172	0	0			
9				173	0	0			
10				173	0	0			

VIDi = virus ID inactivados por UV  
 VID = virus ID  
<sup>a</sup> 5 ratones/grupo; <sup>b</sup> 2 ratones/grupo

15 Los ratones que previamente habían recibido virus ID en solitario perdieron peso y murieron en el día 6. Esto sugiere que el virus ID ya no estaba presente o que no pudieron resistir la alta dosis de virus de provocación.

Los ratones que previamente habían recibido virus ID más virus de provocación ganaron peso y siguieron bien, lo que sugiere que habían adquirido inmunidad a A/WSN.

20

**Experimento 3 - Protección de ratones de A/WSN letal por 40 UHA de virus ID**

La tabla 6 muestra el resultado de ratones a los que se inoculó por vía intranasal 40 UHA (aproximadamente 100 ng de proteína de virus) de virus ID inactivados por UV mezclados con virus A/WSN de provocación o con virus ID

mezclados con virus A/WSN de provocación. A los ratones se les suministró también virus ID en solitario (2/grupo). A los ratones se les inoculó después de anestesia ligera con éter.

Tabla 6

Día	IVID+ virus <sup>a</sup>			VID+ virus <sup>b</sup>			VID en solitario <sup>c</sup>		
	Peso	Enfermos	Muertos	Peso	Enfermos	Muertos	Peso	Enfermos	Muertos
0	64	0	0	78	0	0	42	0	0
1	66	0	0	80	0	0	43	0	0
2	67	0	0	83	0	0	44	0	0
3	67	0	0	86	0	0	47	0	0
4	66	0	0	87	0	0	46	0	0
5	63	1	0	88	0	0	47	0	0
6	57	4	0	85	0	0	47	0	0
7	54	4	0	82	4	0	49	0	0
8	51	3	0	85	2	0	50	0	0
9	39	3	1	85	2	0	50	0	0
10	15	1	2	88	0	0	51	0	0
11	14	1	89	0	0	52	0	0	

VIDi = virus ID inactivados por UV  
 VID = virus ID.  
<sup>a</sup> 4 ratones/grupo; <sup>b</sup> 5 ratones/grupo; <sup>c</sup> 2 ratones/grupo

5

Todos los ratones que recibieron virus ID inactivado más virus de provocación perdieron peso, enfermaron y murieron. Los ratones a los que se suministró virus ID más virus de provocación desarrollaron una enfermedad clínica retrasada y leve (días 7-9) que se resolvió rápidamente. Mostraron una ligera pérdida de peso temporal (días 6 y 7).

10

**Experimento 4 - Protección de ratones de A/WSN letal por 4 UHA de virus ID**

La tabla 7 mostrada a continuación recoge los resultados de ratones a los que se inoculó por vía intranasal 4 UHA (aproximadamente 10 ng de proteína de virus) de virus ID inactivados por UV mezclados con virus A/WSN de provocación o con virus ID mezclados con virus A/WSN de provocación. A los ratones se les suministró también virus ID en solitario (2/grupo). A los ratones se les inoculó después de anestesia ligera con éter.

15

Tabla 7

Día	VIDi+ virus <sup>a</sup>			VID+ virus <sup>b</sup>		
	Peso	Enfermos	Muertos	Peso	Enfermos	Muertos
0	64	0	0	83	0	0
1	66	0	0	85	0	0
2	67	0	0	88	0	0
3	67	0	0	90	0	0
4	66	0	0	88	0	0
5	63	1	0	88	0	0
6	57	4	0	80	3	0
7	54	4	0	75	5	0
8	51	3	0	71	5	0
9	39	3	1	68	5	0
10	15	1	2	54	3	2
11	14		1	44	2	0

VIDi = virus ID inactivados por UV  
 VID = virus ID  
<sup>a</sup> 40 UHA/ratón; 5 ratones/grupo  
<sup>b</sup> 4 UHA/ratón; 5 ratones/grupo

20 Todos los ratones que recibieron virus ID inactivado más virus de provocación perdieron peso, enfermaron y murieron. Todos los ratones a los que se les suministraron 4 UHA de virus ID más virus de provocación desarrollaron enfermedad clínica con pérdida de peso. 3/5 de los ratones (60%) sobrevivieron después de 11 días lo que indicaba

una protección débil para esta baja dosis de virus ID. Sin embargo 1 ratón enfermó y murió en el día 16.

Experimento 5 - Prueba de provocación de todos los ratones que sobrevivieron 3 semanas después de inoculación con dosis elevada de A/WSN

5

La tabla 8 mostrada a continuación recoge los resultados de un experimento que usa los supervivientes de los Experimentos 3 y 4 anteriores. Estos supervivientes se sometieron a prueba de provocación con aproximadamente 1.000 DL<sub>50</sub> de A/WSN

10

Tabla 8

Día	VIDi+ virus <sup>a</sup>			VID+ virus <sup>b</sup>			VID en solitario <sup>c</sup>		
	Peso	Enfermos	Muertos	Peso	Enfermos	Muertos	Peso	Enfermos	Muertos
0	105	0	0	40	0	0	59	0	0
1	108	0	0	41	0	0	61	0	0
2	109	0	0	42	0	0	59	2	0
3	110	0	0	44	0	0	51	2	0
4	109	0	0	44	0	0	48	1	1
5	109	0	0	44	0	0	22		1
6	111	0	0	45	0	0			
7	113	0	0	45	0	0			
8	115	0	0	47	0	0			
9	118	0	0	46	0	0			
10	119	0	0	45	0	0			

VIDi - virus ID inactivados por UV  
 VID - virus ID.  
<sup>a</sup> 40 UHA/ratón; 5 ratones/grupo.  
<sup>b</sup> 4 UHA/ratón; 2 ratones/grupo.  
<sup>c</sup> 40 UHA/ratón; 2 ratones/grupo.

Los ratones que recibieron virus ID en solitario perdieron peso y murieron en el día 6. Esto sugería que el virus ID ya no estaba presente o no era capaz de resistir la dosis elevada de virus de provocación.

15 Todos los ratones que recibieron 40 UHA de virus ID más virus de provocación ganaron peso y siguieron bien, lo que sugiere que habían adquirido inmunidad a A/WSN.

Los 2 ratones que recibieron 4 UHA de virus ID más virus de provocación y sobrevivieron ganaron peso y siguieron bien, lo que sugiere que habían adquirido inmunidad a A/WSN.

20

**EJEMPLO 5 - Duración de la protección mediada por 244/151PR8 en ratones**

La tabla 9 mostrada a continuación recoge cómo 4.000 UHA de 244/151PR8 en solitario protegen a los ratones durante al menos 6 semanas.

25

Los tiempos de inoculación de ratones fueron los siguientes:

Día 0: virus ID

Semana 6: prueba de provocación infecciosa de A/WSN para determinar la protección

30 Semana 9: dosis elevada de prueba de provocación infecciosa de A/WSN para determinar estado inmunitario

Los pesos de los ratones fueron objeto de seguimiento durante 8 días después del Día 0.

Tabla 9

Día	VIDi <sup>a</sup>			VID <sup>a</sup>			VID <sup>b</sup>		
	Peso	Enfermos	Muertos	Peso	Enfermos	Muertos	Peso	Enfermos	Muertos
0	109	0	0	114	0	0	71	0	0
1	112	0	0	113	0	0	72	0	0
2	114	0	0	117	0	0	73	0	0
3	118	0	0	118	0	0	73	0	0
4	117	0	0	121	0	0	75	0	0
5	119	0	0	121	0	0	75	0	0
6	120	0	0	121	0	0	77	0	0
7	121	0	0	122	0	0	79	0	0
8	120	0	0	121	0	0	78	0	0
9	120	0	0	123	0	0	80	0	0

VIDi = virus ID inactivados por UV  
 VID = virus ID  
<sup>a</sup> 6 ratones/grupo  
<sup>b</sup> 3 ratones/grupo

El virus ID en solitario no tenía efectos perjudiciales en la ganancia de peso o el estado clínico.

- 5 La tabla 10 mostrada a continuación recoge el efecto de una prueba de provocación primaria con A/WSN infeccioso en solitario o diluyente 6 semanas después de la administración del virus ID (anterior). Los ratones fueron objeto de seguimiento durante 10 días después del inicio de la semana 6.

Tabla 10

Día	Virus después de VIDi <sup>a</sup>			Virus después de VID <sup>b</sup>			Diluyente después de VID <sup>c</sup>		
	Peso	Enfermos	Muertos	Peso	Enfermos	Muertos	Peso	Enfermos	Muertos
0	132	0	0	136	0	0	71	0	0
1	132	0	0	132	0	0	71	0	0
2	135	0	0	134	0	0	71	0	0
3	129	0	0	134	0	0	71	0	0
4	121	0	0	129	0	0	72	0	0
5	114	3	0	129	0	0	71	0	0
6	108	5	0	131	0	0	70	0	0
7	105	5	0	132	0	0	70	0	0
8	82	5	0	133	0	0	73	0	0
9	80	4	1	131	0	0	73	0	0
10	62	3	1	136	0	0	74	0	0

VIDi = virus ID inactivados por UV  
 VID = virus ID.  
<sup>a</sup> 5 ratones/grupo  
<sup>b</sup> 2 ratones/grupo

10

Los ratones con pruebas de provocación 6 semanas después de haber recibido virus ID inactivado perdieron peso, enfermaron y murieron. Los ratones con pruebas de provocación 6 semanas después de recibir virus ID siguieron ganando peso (aparte de una ligera pérdida en los días 4 y 5) y no mostraron enfermedad clínica.

- 15 La tabla 11 mostrada a continuación recoge los resultados de la prueba de provocación en ratones (anteriores) libres de enfermedad clínica (y que ganaron peso en conjunto) con una dosis elevada (aproximadamente 1.000 DL<sub>50</sub>) de A/WSN en solitario. Los ratones fueron objeto de seguimiento durante el estado inmune durante 10 días después del inicio de la semana 9.

Tabla 11

Día	Virus después de VIDi <sup>a</sup>			Virus después de VID <sup>a</sup>			Virus en solitario <sup>b</sup>		
	Peso	Enfermos	Muertos	Peso	Enfermos	Muertos	Peso	Enfermos	Muertos
0	No realizado todavía enfermo			147	0	0	55	0	0
1				149	0	0	54	0	0
2				149	0	0	53	2	0
3				148	0	0	47	2	0
4				150	0	0	45	2	0
5				151	0	0	42	1	1
6				153	0	0	18		1
7				153	0	0			
8				156	0	0			
9				155	0	0			
10				157	0	0			

VIDi = virus ID inactivados por UV;  
 VID = virus ID.  
<sup>a</sup> 5 ratones/grupo.  
<sup>b</sup> 2 ratones/grupo; control para virus de provocación; no inoculados antes

En comparación con un control (sin tratamiento VID), los ratones tratados con VID anteriormente resistieron dosis elevadas de prueba de provocación letal lo que demostraba que habían adquirido inmunidad a A/WSN.

5

**EJEMPLO 6 – El 244/151PR8 es débilmente terapéutico cuando se suministró 21 h después de la infección**

La tabla 12 mostrada a continuación recoge los resultados de infección de ratones con A/WSN seguido por administración de 244/151PR8 después de 21 horas o 48 horas más (no mostrado).

10

Tabla 12

Día	Virus seguido por VIDi a 21 h <sup>a</sup>			Virus seguido por VID a 21 h <sup>a</sup>			Diluyente seguido por VID a 21 h <sup>p</sup>		
	Peso	Enfermos	Muertos	Peso	Enfermos	Muertos	Peso	Enfermos	Muertos
0	132	0	0	129	0	0	31	0	0
1	135	0	0	132	0	0	31	0	0
2	131	3	0	135	0	0	34	0	0
3	116	7	0	137	0	0	36	0	0
4	108	7	0	138	0	0	39	0	0
5	101	4	3	131	1	0	40	0	0
6	29		4	118	7	0	41	0	0
7				110	2	5	43	0	0
8				35	2		43	0	0
9				36	2		44	0	0
10				35	2		44	0	0

VIDi = virus ID inactivados por UV  
 VID = virus ID.  
<sup>a</sup> 7 ratones/grupo.  
<sup>b</sup> 2 ratones/grupo.

El tratamiento con virus ID 21 h después de la infección por A/WSN retrasó la pérdida de peso y la enfermedad clínica en los ratones durante 2 días. 2/7 de los ratones (29%) se recuperaron en comparación con 0/7 de ratones que recibieron virus ID inactivado. Sin embargo, era una prueba de provocación anormalmente intensa, con el 100% de ratones que estaban enfermos en el día 3. Los virus ID no ofrecieron protección cuando se suministró 48 horas después de la infección.

15

**EJEMPLO 7 - Una dosis elevada de 244/151PR8 previene la infección, la enfermedad y la muerte causadas por A/WSN.**

20

La tabla 13 mostrada a continuación recoge los resultados en los que una dosis elevada de 244/151PR8 previene la

infección primaria, la enfermedad y la muerte causada por A/WSN, pero produce una inmunidad convencional baja a prueba de provocación con A/WSN en dosis elevadas, en comparación con la inmunidad resultante de la administración de un virus ID más diluido.

5 Tiempo de las inoculaciones:

Día 0: ratones inoculados con una mezcla de virus ID + A/WSN (infección primaria). Todos los ratones resultaron protegidos, salvo algunos ratones (3/5) que recibieron 4 UHA (columna 3).

10 Día 21: se sometió a los ratones a prueba de provocación con una dosis elevada (aproximadamente 1.000 DL<sub>50</sub>) de virus de provocación A/WSN. Los datos se muestran en la tabla 13 (columnas 5-7) mostrada a continuación.

Tabla 13

Dosis de virus ID (UHA)	Lote #	Experimento #	Infección primaria Nº muertos / nº infectados	Dosis elevada prueba de provocación		
				Pérdida de peso	Nº enfermos / nº provocación	Nº muertos / nº provocación
4.000	793	3477	0/7	Sí	5/7 (71%) *	4/7 (57%) *
	793	3528	0/4	Sí	4/4 (100%)	2/4 (50%)
	797	3563	0/4	Sí	4/4 (100%)	3/4 (75%)
400	793	3487	0/4	No	0/4	
	797	3563	0/4	No	0/4	
40	793	3498	0/5	No	0/5	
	793	3563	0/4	No	0/4	
	797	3512	0/4	No	0/4	
4	793	3512	2/5	No	0/2	

\* media = 87% enfermos y 60% muertos.

15 La más alta concentración de virus ID (4.000 UHA/ratón o dilución 1/1) protege a los animales de A/WSN pero no los hace inmunes a una prueba de provocación posterior; sin embargo cantidades *menores* de virus ID (1/10 y 1/100) protegen y además permiten que se desarrolle inmunidad a A/WSN. Virus ID 1/1.000 proporcionan aproximadamente el 50% de protección de la infección primaria, y los ratones supervivientes son inmunes a la prueba de provocación.

20

Sin pretender estar limitados por ninguna teoría, puede suceder que la máxima concentración de virus ID redujera la multiplicación de A/WSN de la infección primaria en tal grado que no fuera inmunizante.

El experimento revela la eficacia del virus ID y muestra que será preciso ajustar la dosis de virus ID de manera que permita que se desarrolle inmunidad. Un exceso de virus ID podría ser contraproducente en términos de desarrollo de inmunidad en un individuo.

25

**EJEMPLO 8 - Actividad relativa de los virus ID en ratones contra virus de provocación A/WSN**

30 Los virus ID se purificaron y estandarizaron de acuerdo con su actividad de hemaglutinación (que es directamente proporcional al número de partículas de virus presentes). Se realizó una valoración de la actividad de virus ID en ratones con un intervalo de más de 1.000 veces la dosis con virus de provocación A/WSN. A los ratones se les inoculó simultáneamente con dosis graduadas de virus ID + A/WSN o virus ID inactivados por UV + A/WSN (datos no mostrados) y se vigiló su peso y su estado clínico. La mayoría de los ratones que recibieron virus ID inactivado +  
35 A/WSN sufrieron pérdida de peso de ≥20% de peso corporal, enfermedad clínica grave y murieron. La tabla 14 mostrada a continuación recoge que los ratones protegidos (++++) eran prácticamente indistinguibles de los controles inoculados con placebo.

Tabla 14

UHA/ratón	244/151PR8 <sup>a,b</sup>		220/Vic		220/PR8	317/Vic
	793	797	792	798	794	796
4.000	++++/3477 ++++/3528	++++/3563	++++/3415 ++++/3527	++++/3588	++++/3511	++++/3517 +++/3554
400	++++/3487	++++/3563	++++/3498	+++/3588	+/3511	+++/3517
40	++++/3498	+++/3563		-/3588	+/3511	-/3517
	+++/3512					
4	+/3512					

<sup>a</sup> Virus ID con su número de lote número; obsérvese que 793 y 797 son preparaciones independientes obtenidas de la misma fuente.

<sup>b</sup> La protección está comprendida entre ausencia de pérdida de peso o enfermedad clínica (++++), grados diversos de pérdida de peso y enfermedad clínica (+++ a +) y pérdida de peso y enfermedad clínica que no difería de los ratones de control que recibieron virus ID inactivado + A/WSN (-). '3477' etc. son números de experimento. PR8 (A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)) y Vic (A/Victoria/3/75 (H3N2)) son los virus auxiliares.

El virus ID más activo es 244/151PR8, que protege a los ratones casi completamente a 40 UHA (100 ng de proteína de virus) por ratón. Este resultado se repitió con 2 preparaciones independientes de 244/151PR8.

5

La actividad de los virus ID estuvo comprendida entre 10 veces menos con 220/Vic y 100 veces menos con 220/PR8. La protección siguió el orden:

244/151PR8>220/Vic>317/Vic>220/PR8

10

Aunque no afecta a los resultados y las conclusiones extraídas, UHA suministra sólo una medida aproximada de la cantidad de virus ID, por ejemplo, mide los virus ID y los virus auxiliares.

La tabla 15 mostrada a continuación recoge un resumen de 2-4 experimentos independientes que comparan la actividad profiláctica en ratones mediada por diversos virus protectores definidos contra virus de la gripe infeccioso.

Tabla 15

Virus protector total por ratón (UHA) <sup>a</sup>	244/PR8	244/WSN	220/PR8	220/Vic	317/Vic
4.000	++++ <sup>b</sup>	++++	++++	++++	++++
400	++++	++++	+	+++	+++
40	++++	++++	+	-	-
4	++	++	nr	nr	nr
0 <sup>c</sup>	-	-	-	-	-
Dosis mínima requerida para protección sólida <sup>d</sup>	0,1 µg <sup>e</sup>	0,1 µg <sup>e</sup>	10 µg	1 µg	1 µg

<sup>a</sup> Suministrado como una única dosis intranasal con ligera anestesia simultáneamente con 10 DL<sub>50</sub> de virus de provocación A/WSN.

<sup>b</sup> La escala comprende desde protección completa de pérdida de peso y enfermedad clínica (++++) a ninguna diferencia con los controles a los que se suministró virus protector inactivado más virus de provocación (-).

<sup>c</sup> Los ratones recibieron 4.000 UHA de virus protector inactivado.

<sup>d</sup> Definida como la mínima dosis de virus protector que efectuaba +++ protección o superior.

<sup>e</sup> Proteína de virus total inoculada por ratón

Nr. no realizado; se usaron grupos de 5-7 ratones; este experimento es representativo de 2-4 experimentos independientes.

### **EJEMPLO 9 - Tratamiento de ratones con virus protector 244/PR8 24 h después de la infección**

20

El tratamiento de ratones infectados, realizado antes, con virus protector no definido, no tuvo ningún beneficio terapéutico. A los ratones se les inoculó por instilación intranasal (tal como se describe en ejemplos anteriores) con virus A/WSN infeccioso (aproximadamente 2,5 DLM<sub>50</sub> (dosis letal murina al 50%) aproximadamente 24 h después los ratones inoculados se trataron con una sola dosis de virus ID de control inactivados por UV o con virus ID activos

25 (ambos a 4.000 UHA, que es aproximadamente 10 µg de proteína de virus). Los ratones no infectados también fueron inoculados con virus ID. Todas las inoculaciones se realizaron (tal como se ha descrito en ejemplos anteriores) con anestesia ligera con éter.

La tabla 16 mostrada a continuación recoge el destino de los ratones que recibieron una dosis baja de virus infectante, seguido por la administración de virus ID 24 h después con respecto a un control de administración de virus ID inactivado. Se realizó un control adicional de ratones no infectados en el que se administró virus ID en solitario.

Tabla 16

Día de infección	Virus + virus IDi 24 h después de la infección <sup>a</sup>			Virus + virus ID 24 h después de la infección <sup>a</sup>			virus ID 24 h después de la infección <sup>b</sup>		
	Peso	Enfermos	Muertos	Peso	Enfermos	Muertos	Peso	Enfermos	Muertos
0	114	0	0	114	0	0	35	0	0
1	114	0	0	116	0	0	36	0	0
2	112	0	0	112	0	0	35	0	0
3	106	6	0	112	0	0	35	0	0
4	102	6	0	116	0	0	38	0	0
5	95	5	1	116	0	0	37	0	0
6	74	3	3	117	0	0	36	0	0
7	31		2	119	0	0	37	0	0
8				115	?1	0	37	0	0
9				116	?1	0	38	0	0
10				117	0	0	38	0	0
11				117	?2	0	37	0	0
12				118	?1	0	37	0	0
13				118	0	0	37	0	0
14			121	121	0	0	39	0	0

VPI, virus protector inactivado por UV; ID, virus interferente defectuoso; el peso se indica en gramos; se muestra el número de ratones enfermos/muertos en cada grupo ocurridos cada día. El signo (?) se refiere a ratones que pueden haber estado enfermos, pero no gravemente enfermos.  
<sup>a</sup> 6 ratones/grupo; <sup>b</sup> 2 ratones/grupo).

10 Todos los ratones infectados tratados con virus ID inactivado de control perdieron peso, y estaban enfermos en el día 3 después de la infección. Todos los ratones habían muerto en el día 7.

15 Los ratones infectados tratados con virus ID perdieron poco peso y/o dejaron de ganar peso, pero se mantuvieron clínicamente normales durante el periodo en que el grupo de control estaba muriendo. Existió una posible enfermedad leve en los días 8, 9, 11 y 12, pero fue transitoria. Todos los ratones (100%) estaban sanos al final del experimento.

20 Tres semanas después de la infección, los ratones que habían sido protegidos con virus ID (columna 2 en la tabla 16 anterior) fueron sometidos a prueba de provocación por vía intranasal con una fuerte dosis letal de A/WSN. Los ratones resultaron completamente indemnes según el criterio del peso y los signos clínicos, mientras que todos los ratones de control que antes no habían experimentado ningún virus de la gripe murieron. La dosis de virus usada es demasiado grande para que el virus ID proteja contra ella, así que estos datos sugieren que los ratones habían desarrollado una inmunidad adaptativa a A/WSN aunque no habían estado claramente enfermos durante la primera infección.

25 La tabla 17 mostrada a continuación recoge el destino de los ratones que recibieron una dosis intermedia (aproximadamente 5 DLM<sub>50</sub> de virus A/WSN infectante, seguido por la administración de virus ID 24 h más tarde con respecto a un control de administración de virus ID inactivado (ambos a 4.000 UHA que es aproximadamente 10 µg de proteína de virus). Se realizó un control adicional de ratones no infectados en el que se administró virus ID en solitario.

30

Tabla 17

Día de infección	Virus + virus IDi 24 h después de la infección <sup>a</sup>			Virus + virus ID 24 h después de la infección <sup>a</sup>			Virus ID 24 h después de la infección <sup>b</sup>		
	Peso	Enfermos	Muertos	Peso	Enfermos	Muertos	Peso	Enfermos	Muertos
0	114	0	0	115	0	0	45	0	0
1	114	0	0	114	0	0	45	0	0
2	113	0	0	109	0	0	43	0	0
3	108	0	0	106	0	0	40	0	0
4	101	4	0	103	4	0	38	1	0
5	93	6	0	104	3	0	38	1	0
6	88	1	5	104	1	0	38	1	0
7	14	1	0	101	5	0	37	0	1
8	13		1	98	6	0	21	0	0
9			0	94	4	1	22	0	0
10			0	81	3	1	22	0	0
11			0	70	2	0	22	0	0
12			0	72	2	0	22	0	0
13			0	72	1	0	22	0	0
14			0	76	1	0	22	0	0
15			0	78	1	0	23	0	0
16			0	79	1	0	23	0	0
17			0	79	0	0	24	0	0

IDi, virus interferente defectuoso inactivado por UV; ID, interferente defectuoso.  
<sup>a</sup> 6 ratones/grupo; <sup>b</sup> 2 ratones/grupo).

Todos los ratones infectados tratados con virus ID inactivado de control perdieron peso, y estaban enfermos en el día 5. La mayoría (83%) de los ratones habían muerto (o habían sido sacrificados) en el día 6. Todos habían muerto en el día 8.

Los ratones infectados tratados con virus ID perdieron peso y sufrieron enfermedad clínica al mismo tiempo que el grupo de control infectado. Sin embargo, la enfermedad clínica fue más leve, se produjo durante un periodo más extendido, y tuvo lugar en 2 episodios que alcanzaron su máximo en los días 4 y 8. Dos ratones murieron (en los días 9 y 10) y el resto (4/6 o el 67%) se recuperó.

Uno de los ratones inoculados con VP en solitario enfermó y murió. Se trata de un suceso muy inhabitual, la única vez en varios años de trabajo en que ocurrió.

15 La tabla 18 mostrada a continuación recoge el desenlace en ratones que recibieron una dosis más alta (aproximadamente 10 DLM<sub>50</sub> de virus A/WSN infectante, seguido por la administración de virus ID 24 h después con respecto a un control de administración de virus ID inactivado (ambos a 4.000 UHA que es aproximadamente 10 µg de proteína de virus). Se realizó un control adicional de ratones no infectados en el que se administró virus ID en solitario.

20

Tabla 18

Día de infección	Virus + virus IDi 24 h después de la infección <sup>a</sup>			Virus + virus ID 24 h después de la infección <sup>a</sup>			virus ID 24 h después de la infección <sup>b</sup>		
	Peso	Enfermos	Muertos	Peso	Enfermos	Muertos	Peso	Enfermos	Muertos
0	112	0	0	115	0	0	46	0	0
1	110	0	0	115	0	0	46	0	0
2	108	0	0	113	0	0	46	0	0
3	99	4	0	106	0	0	45	0	0
4	94	5	0	110	0	0	47	0	0
5	88	3	3	112	1	0	48	0	0
6	44	1	2	105	4	0	49	0	0
7	13		1	100	3	1	50	0	0
8				84	3	0	51	0	0
9				81	4	0	51	0	0
10				80	3	1	53	0	0
11				68	2	0	53	0	0
12				69	2	0	52	0	0
13				70	1	0	53	0	0
14				70	1	0	54	0	0
15				71	1	0	55	0	0
16				75	1	0	56	0	0
17				75	1	0	57	0	0

IDI, virus interferente defectuoso inactivado por UV; virus ID, virus interferente defectuoso.  
<sup>a</sup> 6 ratones/grupo; <sup>b</sup> 2 ratones/grupo).

Todos los ratones infectados tratados con virus ID de control perdieron peso y en su mayoría estaban enfermos en el día 4. Todos los ratones estaban muertos o habían sido sacrificados en el día 7.

5

Los ratones infectados tratados con virus ID perdieron peso y sufrieron un cierto retraso en la enfermedad clínica que se produjo durante un periodo extendido. Dos ratones murieron (días 7 y 10), y el resto (67%) se recuperó o estaba recuperándose.

**10 EJEMPLO 10 - Tratamiento de ratones con virus ID 244/PR8 48 h después de la infección**

Tal como se describe en el Ejemplo 8, aunque los ratones infectados recibieron una dosis de virus ID 48 h después de la infección.

15 La tabla 19 mostrada a continuación recoge el desenlace en ratones que recibieron una dosis intermedia (aproximadamente 5 DLM<sub>50</sub> de virus A/WSN infectante, seguido de la administración de virus ID 48 h después con respecto a un control de administración de virus ID inactivado (ambos a 4.000 UHA que es aproximadamente 10 µg de proteína de virus).

Tabla 19

Día de infección	Virus + virus IDi 48 h después de la infección <sup>a</sup>			Virus + virus ID 48 h después de la infección <sup>b</sup>		
	Peso	Enfermos	Muertos	Peso	Enfermos	Muertos
0	109	0	0	139	0	0
1	108	0	0	141	0	0
2	111	0	0	142	0	0
3	107	0	0	138	0	0
4	99	4	0	133	0	0
5	90	4	1	136	0	0
6	71	4	0	131	2	0
7	69		4	121	2	1
8				97	5	0
9				92	4	1
10				73	3	2
11				39	2	0
12				39	2	0
13				40	2	0
14				42	1	0
15				42	2	0
16				44	2	0
17				45	0	0

Virus IDi, virus interferente defectuoso inactivado por UV; virus ID, virus interferente defectuoso; g, peso en gramos; se muestra el número de ratones enfermos/muertos en cada grupo que se produjo en el día. El signo (?) se refiere a ratones que pueden haber estado enfermos, pero no claramente enfermos.  
<sup>a</sup> 5 ratones/grupo; <sup>b</sup> 6 ratones/grupo; <sup>c</sup> 2 ratones/grupo).

Todos los ratones infectados tratados con virus ID inactivado de control perdieron peso, y estaban enfermos en el día 5 después de la infección. Todos los ratones estaban muertos en el día 7.

5

Los ratones infectados tratados 48 h después de la infección con virus ID perdieron peso, pero la enfermedad se retrasó y no se observó hasta el día 6. No se produjeron muertes (4/6) hasta los días 7, 9 y 10. Dos de los 6 ratones (33%) se recuperaron totalmente.

#### 10 EJEMPLO 11 – El ARNi 244 reduce la producción de virus

Se clonó el ARNi 244 en el plásmido de expresión Poll pPOLI-SapIT, de manera que el vector expresa un transcrito en sentido ARNv. Este se transfectó en células 293T junto con los 12 plásmidos requeridos para generar virus WSN infeccioso. La mezcla de ADN contenía cantidades diversas del plásmido 244 (0-0,5 µg), más 0,5 µg de cada segmento génico de WSN (con promotores Poll), 0,5 µg de cada uno de los plásmidos de expresión PB1 y PB2, 0,1 µg de plásmido de expresión PA y 1 µg de plásmido de expresión NP. Después de 24 h, se sometieron las células 293T a tripsinización, se mezclaron con células MDCK y resembraron en placa. Después de 7 días más se recogió el cultivo sobrenadante, y se determinó la producción de virus por ensayo HA.

20

Tabla 20

Plásmido de ARNi 244 (µg)	Producción de virus (UHA/ml)	Producción de virus como % de control
0	19.200	100
0,1	9.600	50
0,25	1.600	8
0,5	300	1,6

La tabla 20 muestra que al aumentar la cantidad de plásmido 244, la producción total de virus según se determina por HA se redujo en el 98,4%. Un exceso de ARNi en el inóculo reduce la producción de virus a cantidades inutilizables.

25

**EJEMPLO 12 – El virus protector previene la enfermedad clínica pero permite que se desarrolle inmunidad adaptativa al virus de provocación**

Tres semanas después de proteger a los ratones de 10 DL<sub>50</sub> de A/WSN, se realizó una nueva prueba de provocación con una dosis muy superior de A/WSN (10.000 DL<sub>50</sub>). Se usó esta dosis porque supera ampliamente al virus protector neto (datos no mostrados), y permite así la valoración de la respuesta inmunitaria de los linfocitos B y T específicos para A/WSN. La fig. 3 (c, f, i) muestra que todos los grupos de ratones supervivientes eran completamente inmunes a la nueva prueba de provocación. Como los animales que recibieron 400 ó 40 UHA de virus protector no mostraron signo de enfermedad durante la prueba de provocación primaria, su supervivencia a la segunda prueba de provocación con número alto de virus muestra que los ratones desarrollaron inmunidad protectora, y por tanto que el virus protector convierte de manera eficaz la dosis letal inicial de virus virulento en una vacuna atenuada subclínica. La tabla 21 mostrada a continuación recoge que la máxima dosis de virus protector proporciona sólo un débil efecto de vacuna. De forma contraria a la intuición, ratones que recibieron la dosis máxima de virus protector (4.000 UHA) estaban menos protegidos de la segunda prueba de provocación, lo que sugiere que la replicación de virus y la producción de antígenos están tan intensamente suprimidas en esta situación que la infección resultante es sólo débilmente inmunógena.

Tabla 21

Primera prueba de provocación		Segunda prueba de provocación		
Dosis de virus protector (UHA)	Número de muertos / número de infectados	Pérdida de peso	Número de enfermos / número de provocación	Número de muertos / número de provocación
4.000	0/7	Sí	5/7 (71%) <sup>b</sup>	4/7 (57%) <sup>c</sup>
	0/4	Sí	4/4 (100%)	2/4 (50%)
	0/4	Sí	4/4 (100%)	3/4 (75%)
400	0/4	No	0/4	na
	0/4	No	0/4	na
40	0/5	No	0/5	na
	0/4	No	0/4	na
	0/4	No	0/4	na
4	2/5	No	0/2	na
0 <sup>d</sup>	5/5	na	na	na

<sup>a</sup> A los ratones se les inoculó por vía intranasal una mezcla de virus protector + 10 DL<sub>50</sub> virus de provocación A/WSN (primera prueba de provocación: columnas 1 y 2); y a continuación 3 semanas después se les inoculó 10.000 DL<sub>50</sub> de A/WSN en solitario (segunda prueba de provocación). Este último experimento prueba la inmunidad adaptativa y no la actividad de virus protector residual, ya que las dosis más elevadas de A/WSN superan completamente al virus protector cuando se suministran simultáneamente (no mostrado). Se muestran los datos de 3 experimentos independientes.

<sup>b</sup> Media = 87% enfermos.

<sup>c</sup> Media = 60% muertos.

<sup>d</sup> Suministro de 4.000 UHA de virus protector inactivado.

Na, no aplicable.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un virus ID de la gripe A humana clonado para su uso como medicamento en el que la secuencia de nucleótidos del segmento 1 de ARN del virus ID de la gripe A clonado comprende: (a) una secuencia seleccionada entre SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; o (b) una secuencia de ácidos nucleicos de al menos el 99% de identidad con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.
- 10 2. El virus de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento de una infección vírica.
- 15 3. El virus de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, para su uso en el tratamiento de una infección vírica **caracterizado por que** la infección es causada por un virus de la gripe A del mismo subtipo o de un subtipo diferente.
- 20 4. El virus de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, para su uso en el tratamiento de una infección vírica **caracterizado por que** la infección es causada por una cepa virulenta del virus de la gripe A.
- 25 5. El virus de acuerdo con las reivindicaciones 3 ó 4 para su uso en el tratamiento de una infección por un virus de la gripe A **caracterizado por que** dicho virus es administrado a un individuo antes o lo antes posible después del contacto con un virus de la gripe A o en cuanto se sospeche una infección gripal vírica.
- 30 6. El virus de acuerdo con la reivindicación 5, para su uso en el tratamiento de una infección por un virus de la gripe A **caracterizado por que** el medicamento es administrado en un plazo de 24 horas después del contacto con un virus de la gripe A o cuando se sospecha una infección gripal vírica.
- 35 7. El virus de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para su uso en el tratamiento de una infección por un virus de la gripe A **caracterizado por que** el individuo es un animal o un ser humano.
- 40 8. El virus de acuerdo con la reivindicación 7, para su uso en el tratamiento de una infección por un virus de la gripe A **caracterizado por que** el animal es seleccionado entre un cerdo, un caballo, un perro, un gato o un ave.
- 45 9. El virus de acuerdo con la reivindicación 8, para su uso en el tratamiento de una infección por un virus de la gripe A **caracterizado por que** el individuo es una especie aviar seleccionada entre patos, gansos, pavos o gallinas.
10. El virus de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para su uso en el tratamiento de una infección por un virus de la gripe A **caracterizado por que** el medicamento es para su administración por vía mucosa.
11. El virus de acuerdo con la reivindicación 10, para su uso en el tratamiento de una infección por un virus de la gripe A **caracterizado por que** el medicamento es para su administración por vía intranasal.
12. Una composición farmacéutica que comprende un virus ID de la gripe A humana clonado en el que la secuencia de nucleótidos de segmento 1 de ARN del virus de la gripe A clonado comprende: (a) una secuencia seleccionada entre SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; o (b) una secuencia de ácidos nucleicos de al menos el 99% de identidad con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; en el que además dicho virus ID de la gripe A humana clonado es eficaz en el tratamiento de una infección vírica.

AGTAGAAACAAGGTCGTTTTTAAACTATTCGACACTAATTGATGGCCATCC  
GAATTCTTTTGGTCGCTGTCTGGCTGTCA

GTAAGTATGCTAGAGTCCCGTTTCCGTTTCATTACCAACACCACATCCCCT  
TGCCCAATTAGCACATTAGCCTTCTCTCC

TTTCGCAAGGTTGCTCAGTTCATTGATGCTTAGTGCTGGCCCATATCTCTT  
GTCCTCTTTGCCCAGAATGAGGAATCCCC

TCAGTCTTCTCCTGTCTTCCTGATGTGTACTTCTTGATTATGGCCATATGGT  
CCACGGTGGTTTTTGTGAGTATCTCGCG

GGTGCGAGACTGCGACATTAGATTTCTTAGTTCTTTTATTCTTTCCATATTG  
AATATATTTGACCTGCTTTCGCT

## Figura 1

AGTAGAAACAAGGTCGTTTTTAAACTATTCGACACTAATTGATGGCCATCC  
GAATTCTTTTGGTCGCTGTCTGGCTGTCA

GTAAGTATGCTAGAGTCCCGTTTCCGTTTCATTACCAACACCACATCCCCT  
TGCCCAATTAGCACATTAGCCTTCTCTCC

TTTCGCAAGGTTGCTCAGTTCATTGATGCTTAGTGCTGGCCCATATCTCTT  
GTCCTCTTTGCCCAGAATGAGGAATCCCC

TCAGTCTTCTCCTGTCTTCCTGATGTGTACTTCTTGATTATGGCCATATGGT  
CCACGGTGGTTTTTGTGAGTATCTCGCG

GGTGCGAGACTGCGACATTAGATTTCTTAGTTCTTTTATTCTTTCCATATTG  
AATATAATTGACCTGCTTTCGCT

## Figura 2

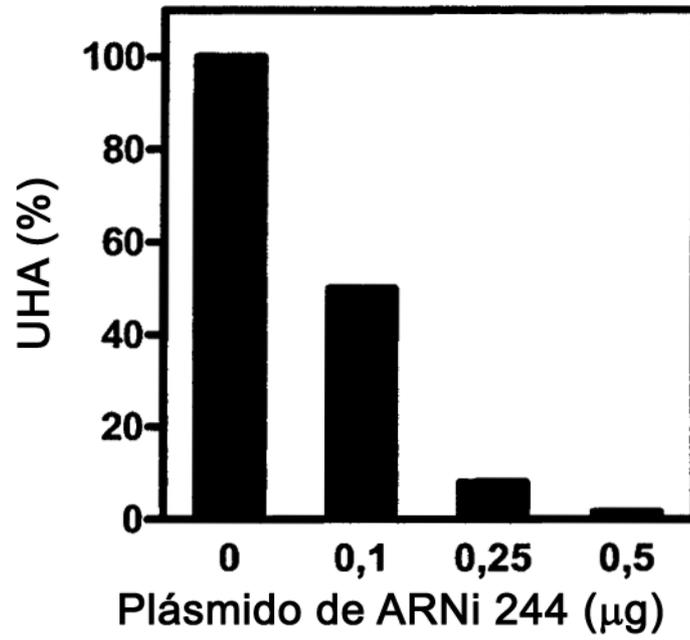


Figura 3

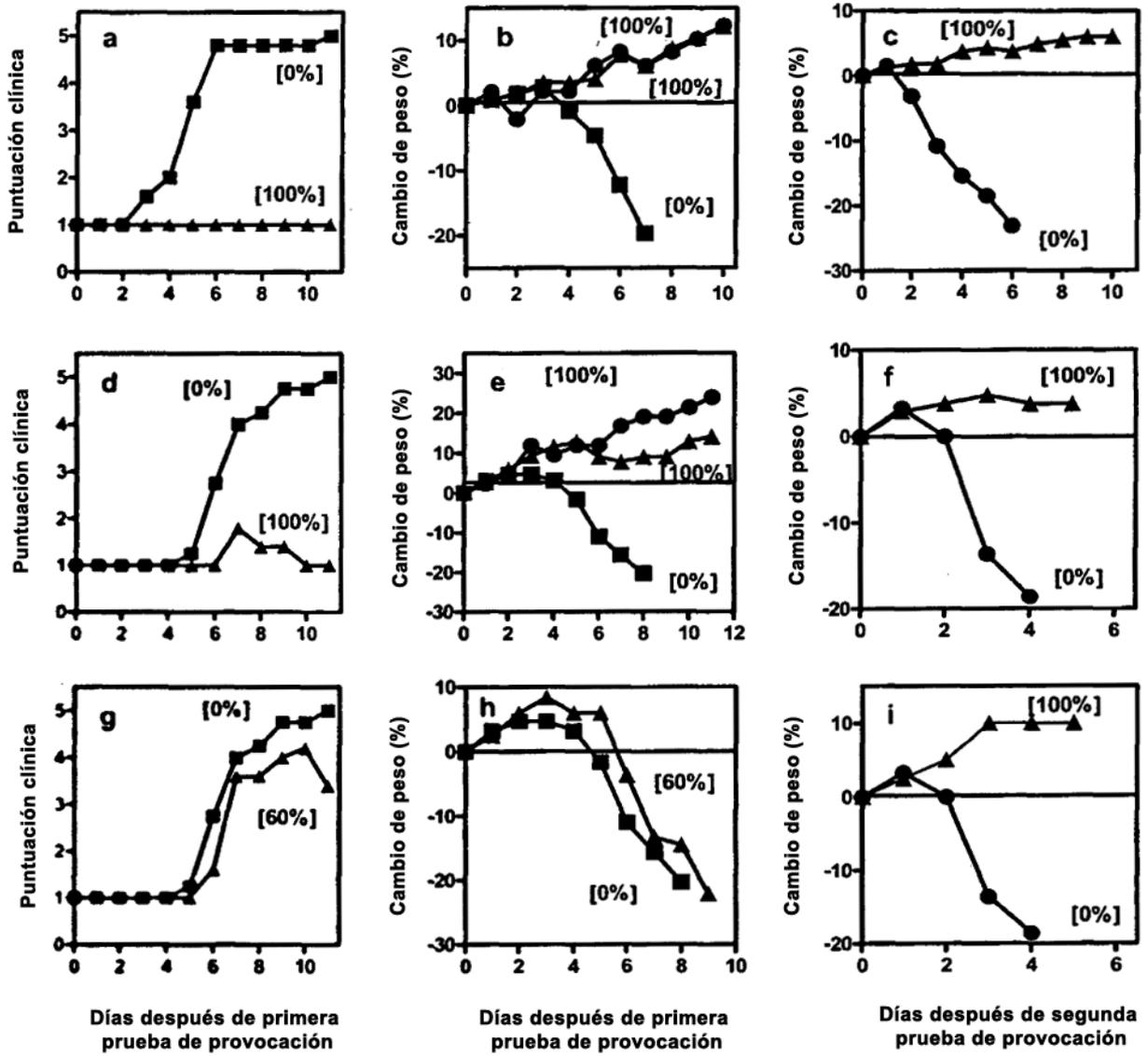


Figura 4

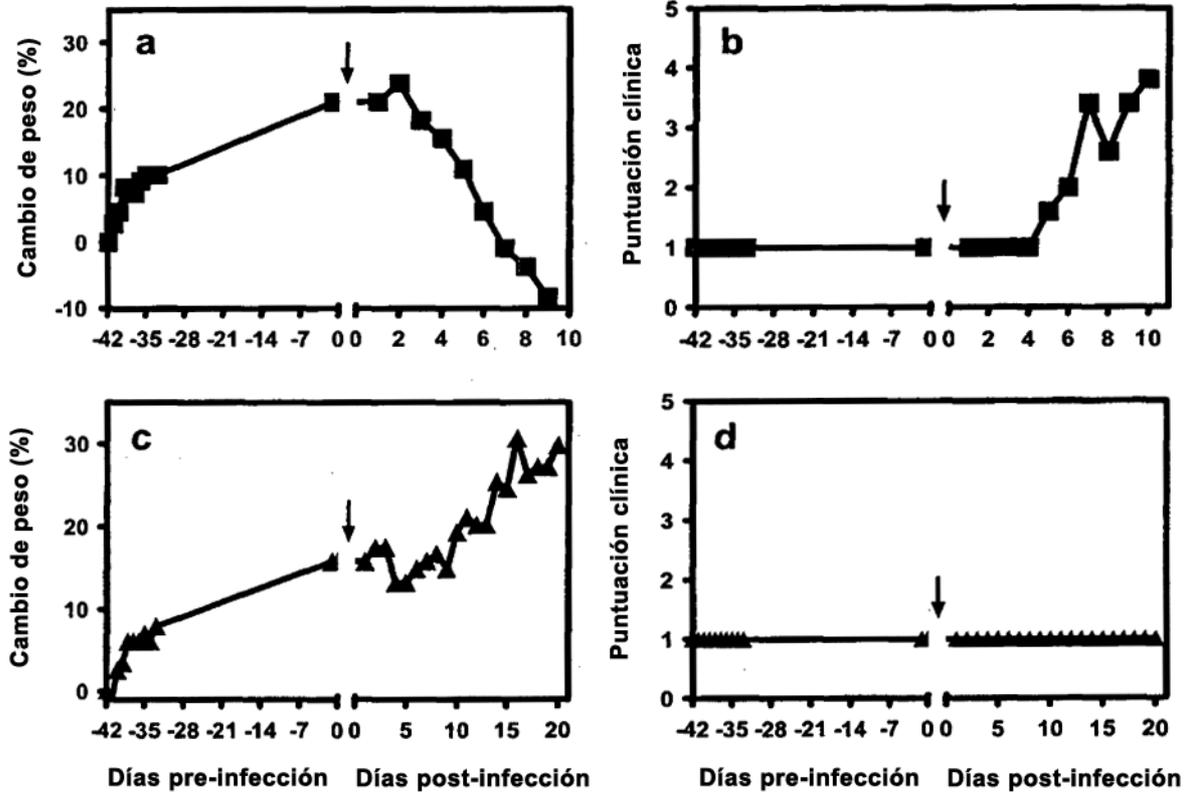


Figura 5

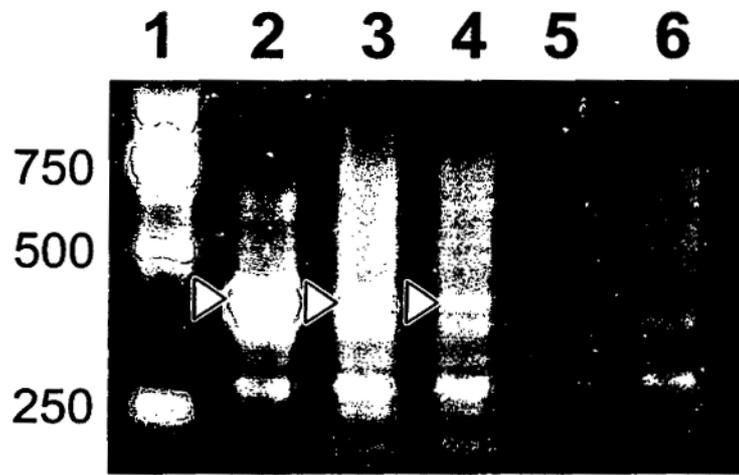


Figura 6