

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 796 930**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7105 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.01.2015 PCT/US2015/012704**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.07.2015 WO15112873**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.01.2015 E 15739913 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2020 EP 3096621**

54 Título: **Silenciamiento de ARNip mediado por E. coli de la gripe aviar en pollos**

30 Prioridad:

23.01.2014 US 201461930821 P
29.04.2014 US 201461986033 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.11.2020

73 Titular/es:

**COLORADO STATE UNIVERSITY RESEARCH
FOUNDATION (100.0%)
P.O. Box 483
Fort Collins, CO 80522, US**

72 Inventor/es:

**LINKE, LYNDESEY M.;
SALMAN, MO D. y
WILUSZ, JEFFREY**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 796 930 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

Silenciamiento de ARNip mediado por *E. coli* de la gripe aviar en pollos

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

1. CAMPO DE LA INVENCION

5 [0001] Esta invención se refiere a composiciones y métodos para tratar o prevenir la gripe aviar en aves de corral. Más específicamente, esta invención se refiere a composiciones de ARNip que interfieren con la replicación viral de la gripe aviar en pollos y otras aves de corral.

2. BREVE DESCRIPCION DE LA TÉCNICA RELACIONADA

10 [0002] El virus de la gripe aviar (AIV) es una enfermedad viral que infecta tejidos específicos en muchas especies aviarias, incluidos tejidos del sistema respiratorio, digestivo y/o nervioso. Aunque es raramente fatal en aves salvajes, el AIV es altamente contagioso y a menudo fatal cuando se transmite a aves de corral domésticas (Swayne y Halvorson 2008, Capua y Marangon 2006, Horimoto y Kawaoka 2001). Los virus de la gripe aviar altamente patógena (HPAI) infectan rápidamente a aves de corral y son a menudo fatales, con una tasa de letalidad que se acerca al 100% (Horimoto y Kawaoka 2001). Los virus de la gripe aviar poco patógena (LPAI) causan típicamente una enfermedad moderada que puede pasar sin ser detectada; sin embargo, el efecto económico de la LPAI radica en la pérdida de producción. El riesgo de brotes de LPAI y HPAI son amenazas significativas para la industria avícola.

20 [0003] Los métodos profilácticos actuales para el AIV en aves de corral son limitados. Las vacunas disponibles no confieren inmunidad completa, como se ha demostrado por la capacidad del virus de replicarse en aves vacunadas (Capua et al 2004). Las vacunas dependen de un sistema inmunitario sano y podrían volverse inefectivas debido a la evolución antigénica viral (Arzt et al 2010, Escorcía et al 2008, Zhou et al 2008, Bennink et al 2004, Ge et al 2004). Los resultados de estudios precedentes mostraron que aislados de campo de AIV de aves de corral presentaban variaciones constantes en su información genética y la persistencia del virus en el campo fue posiblemente ayudada por diferencias antigénicas atribuidas a la cepa de la vacuna (Escorcía et al 2008, Lee et al 2004). De manera interesante, algunas de las vacunas creadas para controlar brotes de HPAI fueron precursoras de nuevos brotes de HPAI. La protección de la vacuna puede llevar más de una semana en adquirirse (Kim et al 2009); por lo tanto, la vacunación durante un brote ofrece poca protección. La vacunación es más eficaz mediante inyección intramuscular, que no es práctica para la administración de vacunas a gran escala. Finalmente, un almacenamiento y una manipulación inapropiados lleva a menudo al fracaso de la vacuna. También hay preocupaciones crecientes de que los actuales virus aviarios H5N1 se estén volviendo resistentes a la amantadina, la rimantadina y el oseltamivir (Cheung et al 2006, Le et al 2005, de Jong et al 2005). Informes han asociado el tratamiento con estos fármacos comunes con la diseminación de virus resistentes a fármacos. Como ejemplo, en un intento desesperado de proteger sus granjas avícolas, se ha informado de que China ha administrado amantadina durante los brotes de H5N1 de 2005. Este mal uso ha llevado a cepas resistentes a fármacos que están circulando en China y el Sudeste Asiático (Cheung et al 2006). La falta de profilácticos robustos y la naturaleza endémica de esta enfermedad subraya la urgencia para desarrollar medidas de control más eficaces en aves de corral, como medio para controlar la transmisión del AIV y reducir el impacto que tienen los brotes en las operaciones avícolas. Es especialmente valioso considerar nuevas estrategias profilácticas que puedan proteger a las aves de corral contra cualquier subtipo o cepa de AIV.

40 [0004] US2013/225651 y US2007/099858 divulgan composiciones útiles para modular la expresión génica del virus de la gripe usando ARNip. El documento no se pronuncia sobre la incorporación en una bacteria *E. coli* al igual que sobre la presencia de genes *Inv* y *hlvA*.

45 [0005] Xian S. et al. (Nature Biotechnology, vol. 24, n.º 6,1 junio 2006, páginas 697-702) divulgan bacterias *E. coli* no patógenas diseñadas para transcribir varios ARNhc de plásmido con los genes *inv* y *hlvA*, que codifican dos factores bacterianos necesarios para la transferencia exitosa de ARNhc a las células. El documento no se pronuncia sobre la interferencia con la expresión de moléculas de ARN virales de la gripe aviar.

50 [0006] Lage et al. (J.Vis. Exp., 2010) divulgan una bacteria *E. coli* no patógena que comprende un vector procariontico, que comprende una molécula de ADN que codifica uno o más ARNip y un promotor, donde los ARNip interfieren con la expresión génica de ABCB+, y donde la *E. coli* expresa al menos un gen *inv* y al menos un gen *hlvA*. El documento no se pronuncia sobre la interferencia con la expresión de moléculas de ARN virales de la gripe aviar.

[0007] US2010/204297 divulga ARNip que reconocen la ARN-polimerasa viral, que inhibe la producción de virus de la gripe A. El documento no se pronuncia sobre el uso de una *E. coli* no patógena y la presente construcción.

5 [0008] US2010/189691 divulga un vector de *E. coli* no patógena que comprende una molécula de ADN que codifica uno o más ARNip y un promotor, donde el ARNip interfiere con la expresión de ARNm de la beta catenina. El documento no se pronuncia sobre la interferencia con la expresión de moléculas de ARN virales de la gripe aviar.

10 [0009] En ausencia de un control eficaz, los brotes de AIV en aves de corral pueden ser devastadores y las estimaciones de pérdidas económicas potenciales son enormes. Esto es específicamente cierto cuando epidemias de AIV golpean áreas que tienen una densidad más alta de granjas avícolas. Estas áreas se convierten en ubicaciones de alto riesgo de brotes y a menudo se enfrentan a desafíos considerables para controlar la transmisión del AIV, a pesar de las estrictas medidas de bioseguridad y los esfuerzos de despoblación. Una vez transmitido a través de secreciones respiratorias y heces, el periodo de incubación para el AIV puede durar hasta 10 días y la mayoría de aves de corral infectadas diseminan el virus durante 7 a 10 días, permitiendo que el virus circule en una bandada durante un largo periodo de tiempo (Easterday et al 1997). Este periodo de diseminación potencialmente largo aumenta el riesgo de transmisión a aves de corral, especialmente dentro de poblaciones mayores (Easterday et al 1997). El desarrollo de una tecnología antigripal potente es un paso crítico para gestionar y controlar eficazmente la propagación de esta enfermedad en aves de corral para minimizar las pérdidas financieras y los riesgos de transmisión a otras especies susceptibles, incluidos seres humanos.

20 [0010] Las estrategias de vacunación actuales para aves son limitadas, ya que no confieren inmunidad completa, dependen de un sistema inmunitario sano, son susceptibles a la evolución antigénica viral, requieren la manipulación individual de cada ave en una operación avícola comercial a gran escala, tienen una fecha de caducidad limitada y la protección de anticuerpos tras la vacunación tarda varias semanas en adquirirse. Debido a estos desafíos, la vacunación contra el AIV en los Estados Unidos raramente se escoge para el uso profiláctico en aves de corral. Si se adoptara un programa de vacunación de emergencia, ofrecería poca protección si se administrara durante un brote. Además, la creciente evidencia de la emergencia de variantes de AIV resistentes a fármacos plantea un riesgo para el uso de terapias farmacológicas, tales como la amantadina, la rimantadina y el oseltamivir. Estas limitaciones indican una necesidad real de desarrollar un profiláctico que pueda no solo proteger contra diferentes subtipos y cepas resistentes a fármacos de virus, sino que proporcione una protección transitoria si se produjera un brote y la vacunación no es realizable o eficaz en un periodo de tiempo corto.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

30 [0011] La invención está definida por las reivindicaciones anexas. La presente invención proporciona productos y métodos asociados para la transferencia de uno o más ARN interferentes pequeños (ARNip) a una célula aviar usando una bacteria no patógena para la prevención o el tratamiento del virus de la gripe aviar (AIV). El ARNip es complementario a un ARNm de la secuencia NP o PA del AIV. En estudios de exposición con pollos, se demuestra que el ARNip previene el comienzo de síntomas clínicos o reduce la gravedad de la enfermedad, incluida la reducción de los títulos virales o de la diseminación de virus.

40 [0012] En un primer aspecto la presente invención proporciona una bacteria *E. coli* no patógena que incluye un vector procariótico. El vector es una molécula de ADN que codifica uno o más ARNip y un promotor para controlar la transcripción del ARNip. Los ARNip codificados por el vector interfieren con una o más moléculas de ARN virales de la gripe aviar, inhibiendo así la replicación del AIV. Además, la bacteria está diseñada para expresar al menos un gen *inv* y al menos un gen *hlyA*. El producto génico de *inv* ayuda a la bacteria a entrar en la célula diana.

45 [0013] En una forma de realización ventajosa del primer aspecto, el ARNip interfiere con un ARNm de NP, PA, PB1 o PB2. En ejemplos de realización ventajosos adicionales, el ARNip es complementario a una secuencia de ARNm viral de la gripe aviar compartida por una pluralidad de subtipos. Idealmente, el ARNip reconocería una secuencia conservada a través de la mayoría de subtipos. De esta manera, el ARNip sería eficaz contra tantos subtipos como fuera posible. Sin embargo, las secuencias compartidas pueden ser más limitadas y pueden cambiar a lo largo del tiempo. Por consiguiente, el ARNip se puede diseñar para ser eficaz contra una pluralidad de subtipos, aunque no todos, y se puede usar un enfoque de "cóctel" con una variedad de diferentes ARNip para cubrir un amplio espectro de AIV.

50 [0014] En otros ejemplos de realización adicionales del primer aspecto, el ARNip se puede generar a partir de una secuencia de ADN que incluya una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14. De forma similar, el ARNip se puede generar a partir de un plásmido que codifica un transcrito donde el plásmido tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 15 y SEQ ID NO. 17.

[0015] El promotor que se usa para controlar la transcripción del ARNip puede ser un promotor T7, un promotor T3 o un promotor SP6. El ARNip puede reconocer una secuencia conservada, donde esa secuencia conservada reconocida es compartida por una pluralidad de subtipos de gripe aviar. Y el vector procariótico es un plásmido que codifica el gen *inv* y el gen *hlyA*, facilitando así la entrada de la bacteria en la célula y la transferencia del ARNip de la bacteria desde el endosoma tras la entrada.

[0016] En un segundo aspecto la presente invención proporciona un método para tratar o reducir el riesgo de propagar la gripe aviar en unas aves de corral. El método incluye la etapa de administración a las aves de corral de una composición que comprende la bacteria *E. coli* no patógena según el primer aspecto. En una forma de realización ventajosa la composición se administra por vía intranasal o pulverizada como un aerosol adecuado para la inhalación. En ejemplos de realización ventajosos adicionales se puede administrar una pluralidad de poblaciones de bacteria *E. coli*. Cuando se administra una pluralidad de poblaciones, cada población de *E. coli* se puede diseñar para expresar una molécula de ARNip diferente que interfiera con una o más moléculas de ARN virales de la gripe aviar. A través de tal estrategia, se pueden reconocer múltiples ARNm del AIV en una administración profiláctica única.

[0017] En un tercer aspecto la presente invención proporciona una composición farmacéutica que tiene dos bacterias *E. coli* no patógenas diferentes para transferir dos ARNip diferentes. En otras palabras, la primera bacteria *E. coli* no patógena tiene un vector procariótico que codifica un ARNip, donde el primer ARNip codificado interfiere con una o más moléculas de ARN virales de la gripe aviar y la segunda bacteria *E. coli* no patógena tiene un vector procariótico que codifica un ARNip diferente, donde el segundo ARNip codificado interfiere con una molécula de ARN viral de gripe aviar diferente o una porción diferente de la misma molécula de ARN viral de gripe aviar. La composición se proporciona en un portador farmacéuticamente aceptable. En una forma de realización ventajosa la primera secuencia de ARNip codificado puede incluir la SEQ ID NO. 3 y la segunda secuencia de ARNip codificado puede incluir la SEQ ID NO. 4. Las bacterias primera y segunda se pueden diseñar para expresar al menos un gen *inv* y al menos un gen *hlyA*.

[0018] En un cuarto aspecto la presente invención proporciona un vector procariótico que tiene una o más moléculas de ADN que codifican uno o más ARNip, un promotor para controlar la transcripción de los ARNip, al menos un gen *inv* y al menos un gen *hlyA*. Los ARNip codificados interfieren con el ARNm de un virus de gripe aviar. En una forma de realización ventajosa, el vector según el cuarto aspecto puede producir un ARNip que interfiere con un ARNm de NP, PA, PB1 o PB2. Adicionalmente, el ARNip puede incluir una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0019] Para una comprensión más completa de la invención, debe hacerse referencia a la siguiente descripción detallada, tomada en relación con los dibujos anexos, donde:

La figura 1 es una serie de cuatro gráficos (figuras 1A-1D) que muestran la protección del ARNip según se mide por reducción en los títulos medios por día, MOI y virus. * indica una diferencia estadísticamente significativa con la muestra no tratada correspondiente usando la prueba de la suma de rangos de Wilcoxon ($p < 0,05$).

La figura 2 es una imagen que muestra la expresión de ARNm de β -actina (ACTB-282bp) y β 1-integrina (ITGB1-308 bp) en células LMH cultivadas en medio normal de crecimiento (WM), medio de infección (IM) o infectado con A/turkey/Colorado/235497/2003(H8N4) (infectado). Carriles: 1) ITGB1 en WM; 2) ITGB1 en IM; 3) ITGB1 infectado; 4) ACTB en WM; 5) ACTB en IM; 6) ACTB infectado; y 7) control negativo de PCR.

La figura 3 es una serie de seis imágenes que muestran un vector anti-AIV_aleatorio marcado con RFP. Las células LMH de pollo recibieron RFP-vector en dos dosis (alta = $7,8e5$ UFC/ml y baja = $1,95e5$ UFC/ml). Captación de vector evaluada a las 2 y las 24 horas posteriores a la invasión. * Nótese que las flechas blancas señalan hacia áreas de fluorescencia roja, que están oscurecidas en escala de grises.

La figura 4 es una serie de cuatro gráficos (figuras 4A-4D) que muestran la protección del vector anti-AIV según se mide por reducción en los títulos medios por día, MOI y virus. Un asterisco (*) indica una diferencia estadísticamente significativa con la muestra no tratada correspondiente usando la prueba de la suma de rangos de Wilcoxon ($p < 0,05$).

La figura 5 es una serie de seis imágenes que muestran un vector anti-AIV_aleatorio marcado con RFP. Los pollos fueron tratados por vía intranasal con vector RFP y la captación se evaluó a las 15 y las 27 horas

posteriores al tratamiento. *Nótese que las flechas blancas señalan hacia áreas de fluorescencia roja, que están oscurecidas en escala de grises.

La figura 6 es una serie de tres gráficos (figuras 6A-6C) que muestran el título del virus A/chicken/Texas/473-2/10(H6N2) y la proporción de pollos con diseminación de virus diarios a lo largo del periodo de estudio. (A) Título de virus medio (Log EID₅₀ eq/ml) que representa todos los pollos (con diseminación y sin diseminación) representados por día. La línea superior el día 4 es PC; la línea del medio en el día 4 es Aleatorio; y la línea inferior en el día 4 es Cóctel. (B) Título de virus medio que representa pollos con diseminación de virus y representada por día. Para cada día, de izquierda a derecha: Cóctel; Aleatorio; PC. (C) Proporción (%) de pollos con diseminación de virus H6N2 por día, de n=10 pollos en total en cada grupo; sin embargo, el día 10 representa n=9 observaciones en el grupo PC debido a un caso de mortalidad. El título medio por día (B) representa la proporción de pollos con diseminación de virus H6N2 en ese día (C). Para cada día, de izquierda a derecha: Cóctel; Aleatorio; PC.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA FORMA DE REALIZACIÓN PREFERIDA

[0020] Desarrollar una tecnología antigripal potente es un paso crítico para gestionar y controlar eficazmente la propagación del AIV en aves de corral para minimizar las pérdidas financieras y los riesgos de transmisión a otras especies susceptibles, incluidos seres humanos. Las estrategias de vacunación actuales para aves son limitadas, ya que no confieren inmunidad completa, dependen de un sistema inmunitario sano, son susceptibles a la evolución antigénica viral, requieren la manipulación individual de cada ave en una operación avícola comercial a gran escala, tienen una fecha de caducidad limitada y la protección de anticuerpos tras la vacunación tarda varias semanas en adquirirse. Debido a estos desafíos, la vacunación contra el AIV en los Estados Unidos raramente se escoge para el uso profiláctico en aves de corral. Si se adoptara un programa de vacunación de emergencia, ofrecería poca protección si se administrara durante un brote. Además, la creciente evidencia de la emergencia de variantes de AIV resistentes a fármacos plantea un riesgo para el uso de terapias farmacológicas, tales como la amantadina, la rimantadina y el oseltamivir. Estas limitaciones indican una necesidad real de desarrollar un profiláctico que pueda no solo proteger contra diferentes subtipos y cepas resistentes a fármacos de virus, sino que proporcione una protección transitoria si se produjera un brote y la vacunación no es realizable o eficaz en un periodo de tiempo corto.

[0021] La interferencia de ARN (ARNi) usando ARNip se ha explorado para el desarrollo de antivirales alternativos para controlar enfermedades en seres humanos y especies de ganado usando ARNip (Lyll et al 2011, Long et al 2010, Chen et al 2009). La transferencia de agentes de mediación de ARNi ha sido un obstáculo para su aplicación clínica (Li y Shen 2009). Ya que los ARNip son incapaces de cruzar las membranas celulares independientemente, requieren un vehículo de transferencia tal como virus genéticamente modificados y portadores sintéticos (Aigner 2009, Li et al 2006, Ge et al 2004). Estos vehículos de ARNip virales y sintéticos plantean serias limitaciones y preocupaciones para la eficacia clínica (Ge et al 2004). Los vectores virales pueden suscitar fuertes respuestas inmunitarias que causan muerte celular (Davidson y McCray 2011, Ge et al 2004). El control de la dosis de agentes de ARNi con vectores virales es difícil y puede resultar en la saturación de los sistemas de ARNi/micro-ARN, dando como resultado hepatotoxicidad (Beer et al 2010, Hacein-Bey-Abina et al 2008, Grimm et al 2006). Los vectores virales pueden integrarse en el genoma del huésped y llevar a tumorigénesis (Davidson y McCray 2011, Beer et al 2010, Hacein-Bey-Abina et al 2008, Ge et al 2004). De hecho, estudios recientes advierten de efectos inespecíficos de vectores virales de ARN en horquilla corto (ARNhc) que dan como resultado muerte celular y problemas orgánicos en animales transgénicos (Grimm et al 2006). Finalmente, los vehículos de ARN sintéticos tienen rendimientos de transferencia bajos y requieren dosis más altas, que no solo tienen costes prohibitivos, sino que son a menudo tóxicas (Ge et al 2004). En consecuencia, resulta imperativo enfocarse en mejores mecanismos de transferencia para antivirales a base de ARNi, específicamente contra el AIV en aves de corral. Un vehículo de transferencia de ARNip seguro y eficaz que específicamente reconociera los tejidos pulmonares y respiratorios, los sitios principales de infección y replicación del AIV, representaría un enfoque particularmente prometedor. Este tipo de sistema mejoraría la especificidad de transferencia para un profiláctico antigripal más eficaz, a la vez que minimiza las pérdidas de ARNip debido a una administración sistémica y reduce la toxicidad relacionada con el ARNip.

[0022] Por consiguiente, se desarrolló una plataforma de transferencia de ARNi transkingdom (tkRNAi) para proveer a la inhibición del AIV en células epiteliales de pollo. El tkRNAi usa bacterias no patógenas para generar y transferir ARN de silenciamiento a tejidos epiteliales de la mucosa, y demuestra ser un enfoque de transferencia prometedor para prevenir la gripe mediante la administración a las vías respiratorias superiores en pollos. Estas bacterias están genéticamente modificadas para producir un ARNhc específico para una diana de ARNm, invadir las células epiteliales de la mucosa y liberar su carga útil de ARNhc en el citoplasma de las células huésped. Se piensa que, una vez liberado en el citoplasma, estos ARNhc se procesan en ARNip y silencian posteriormente dianas de ARNm complementario, activando así el ARNi (Buttaro y Fruehauf 2010, Xiang et al 2006). El sistema tkRNAi usado aquí está compuesto de bacterias *E. coli* que han sido transformadas con un plásmido generador de ARNhc especial (pMBV43). Estos plásmidos pMBV43 y bacterias *E. coli* portadoras están caracterizados por varios componentes.

Estos incluyen un casete de expresión ARNhc bajo el control del promotor de la T7 ARN-polimerasa, y el terminador para la liberación y la generación exitosas de los ARNip en el citoplasma de las células epiteliales respiratorias susceptibles a la gripe. La introducción de un gen de invasión (*inv*) de *Yersinia pseudotuberculosis* provee para la expresión de la proteína invasina en la superficie de *E. coli*. La invasina interactúa con receptores de integrina $\beta 1$ presentes en la superficie de las células epiteliales de la mucosa, lo que lleva a la captación de las bacterias portadoras en endosomas de las células epiteliales diana. Una vez las *E. coli* se han captado en la célula huésped, necesitan escapar de la vacuola del huésped para la liberación en el citosol. Las bacterias están codificadas para expresar listerolisina O (LLO) del gen *hlyA*, una toxina formadora de poros de *Listeria monocytogenes* (Xiang et al 2006, Mathew et al 2003, Radford et al 2002, Grillot-Courvalin et al 1998). Debido al entorno de bajo pH del lisosoma huésped y a una falta de nutrientes, las bacterias se lisan dentro del endosoma, liberando posteriormente esta toxina bacteriana, que lleva a la rotura de la membrana endosómica (Nguyen y Fruehauf 2009). Ahora en el citoplasma, los ARNhc liberados son procesados en ARNip por Dicer, incorporados en el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), y desencadenan la vía de ARNi para silenciar los genes que son dianas para el silenciamiento. Usando tkRNAi, desarrollamos un ARNi antivírico novedoso capaz de generar y transferir ARNip que reconocen los genes NP y PA del AIV. Este enfoque novedoso se aplicó a un modelo de tejido aviar, cuyo desarrollo también se describe en el presente documento, para demostrar una prueba de concepto *in vitro* para usar vectores anti-AIV para inhibir la replicación y la diseminación de la gripe aviar.

[0023] Los incentivos económicos para vacunar aves de corral contra el AIV son bajos y a menudo debidos a varias limitaciones de la vacuna. Estas limitaciones y falta de incentivo plantean impedimentos significativos para controlar eficazmente los brotes de AIV en aves de corral. El desarrollo de una nueva tecnología antigripal es un paso crítico hacia la gestión y el control eficaces de la propagación de esta enfermedad en aves de corral, minimizando las pérdidas financieras y reduciendo el riesgo de transmisión a otros animales, incluidos seres humanos. La aplicación de metodologías de ARNi para desarrollar un antivírico alternativo contra el AIV es una opción prometedora. Sin embargo, la transferencia de agentes de mediación de ARNi sigue siendo un obstáculo para aprovechar su aplicación clínica. El ARNi transkingdom (tkRNAi) usa bacterias no patógenas para generar y transferir ARNip a tejidos diana, y podrían ser la clave para lograr la aplicación clínica de un enfoque de ARNi. Se construyeron vectores tkRNAi (vectores anti-AIV) para generar ARNip que reconocen los genes virales, NP y PA, y se evaluó la eficacia protectora de estos vectores en el modelo de tejido aviar establecido.

[0024] La captación y la invasión del vector se verificó primero en células LMH de pollo tratadas con vectores marcados con una proteína fluorescente roja. A continuación, las células fueron tratadas con los vectores anti-AIV e infectadas con dos subtipos diferentes de LPAI, H8N4 y H6N2. El análisis de regresión lineal multivariante, controlando el día, reveló diferencias significativas en los títulos de diseminación medios ajustados entre muestras tratadas con los vectores anti-AIV y aquellas no tratadas ($p < 0,05$). Los cócteles de vector que reconocen tanto genes NP como PA proporcionaron un factor de reducción de hasta 10.960 en los títulos de diseminación en los sobrenadantes de células LMH de pollo ($p < 0,05$). Este trabajo demuestra una prueba de concepto *in vitro* para usar estos novedosos vectores anti-AIV para inhibir el AIV en el modelo de tejido aviar establecido. Este trabajo representa el primer caso de este tipo para usar el sistema tkRNAi en un modelo aviar y para inhibir la replicación de la gripe.

[0025] Debido a que las proteínas NP y PA juegan ambas un papel crítico en la transcripción y la replicación del AIV, representan una diana esencial para la inhibición de la replicación del virus por ARNip. El diseño de ARNip que puedan permanecer potentes a través de variaciones y cambios antigénicos requiere el reconocimiento de regiones en un gen que estén conservadas entre diferentes subtipos y cepas del AIV. Debido a su papel en la transcripción y la replicación virales y como una manera de mantener una aptitud viral óptima, NP y PA contienen cada uno una extensión de nucleótidos conservados que se encuentran en la mayoría de virus de la gripe del tipo A. El papel específico que juegan estas secuencias cortas en la replicación viral tiene que determinarse aún. Sin embargo, estas secuencias cortas conservadas se encuentran en los genomas de la gripe de pollos, seres humanos, caninos, equinos y cerdos. A diferencia de los genes NP y PA, los segmentos HA y NA no contienen ninguna extensión de 21 nucleótidos conservados para el diseño de ARNip. La dependencia de estas regiones conservadas para la transcripción y la replicación exitosas hacen de estas secuencias cortas en los genes NP y PA dianas esenciales para el diseño de ARNip.

[0026] Casi toda la investigación que estudia la aplicación de ARNip se evalúa en células de mamíferos y faltan estudios que usen modelos aviarios. El uso de células de mamíferos es una limitación significativa por un par de razones. Primero, como la mayoría de herramientas de diseño de ARNi se desarrollaron usando sistemas de mamíferos, estas herramientas pueden diseñar ARNip que son menos eficaces cuando se introducen en cultivos de células aviarias, lo que conduce a rendimientos de ARNi inferiores. Segundo, el AIV es una enfermedad de especies aviarias. Como tal, resulta imperativo usar un modelo de tejido aviar relevante para determinar si el ARNi es un enfoque válido para prevenir la replicación del AIV en aves de corral. Los virus seleccionados típicamente para estudios previos de transfección de ARNi y de infección viral son virus adaptados al laboratorio, aislados de seres humanos y otros mamíferos. Si buscamos determinar si el ARNi es un enfoque válido para prevenir la

replicación del AIV en aves de corral, resulta crítico realizar estos estudios usando virus de gripe aviar de origen natural aislados comúnmente de aves de corral.

[0027] El AIV está reconocido como un patógeno de prioridad de la categoría C de biodefensa del Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas, una enfermedad económicamente importante de aves de corral y una gran amenaza de salud pública porque los virus originados en animales tienen el potencial para causar la próxima pandemia humana (Carver y Krushinskie 2006, Webster 1997). El AIV afecta a muchas especies de aves de producción de alimento, incluidos pollos, pavos, patos, codornices y gallina de Guinea. En toda la literatura, hay descripciones innumerables de brotes globales significativos de LPAI y HPAI en aves de corral domésticas. Estos brotes son de interés, no solo porque el grado de virulencia observado en aves de corral da como resultado consecuencias económicas graves, sino debido a la capacidad para transmitirse a especies de mamíferos. Las cepas aviarias H5N1 altamente patógenas están actualmente circulando en múltiples países. Los brotes de HPAI en aves de corral han llevado al sacrificio de millones de animales y la pérdida neta de miles de millones de dólares. Desde 2003, las cepas H5N1 han resultado en 648 casos en humanos, de los cuales 384 fueron fatales (2013: WHO Influenza at the human animal interface). Asombrosamente, se ha informado de la infección de seres humanos con el virus LPAI (H7N9), con aproximadamente 150 casos, de los cuales casi un 33% ha resultado en muerte (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades 2014).

[0028] Un factor de riesgo principal para la transmisión del AIV a seres humanos es el contacto directo y la manipulación de aves domésticas (Vong et al 2009, Areechokchai et al 2006, Dinh et al 2006, Wang et al 2006, Bridges et al 2002, Mounts et al 1999), por lo que la mayoría de casos en humanos han ocurrido cuando la estrecha proximidad entre seres humanos y ganado lleva a la transmisión. A medida que el número de virus circulantes aumenta en las aves de corral domésticas, también lo hace el riesgo de transmisión a seres humanos y el potencial para reordenarse en una forma que es más transmisible entre seres humanos (Gatherer 2010). Por lo tanto, respecto a la reducción del riesgo para seres humanos, la prevención del AIV en aves de corral domésticas debe ser un foco principal. La emergencia de un AIV novedoso transmisible en una población que tiene poca o ninguna inmunidad, causaría una pandemia global para la que no hay disponible ninguna vacuna. Estas cepas son de interés particular porque son resistentes a los fármacos antiviricos más rentables, la amantadina y la rimantadina (He et al 2008, Lee et al 2008, Pinto y Lamb 1995, Belshe et al 1988).

[0029] Al igual que resulta crítico contar con protocolos de detección precoz y sistemas de advertencia como medios para controlar y gestionar el AIV en aves de corral, debe haber disponibles medidas de prevención eficaces para prepararse para potenciales brotes. La vacunación de aves de corral domésticas puede ayudar a controlar los virus HPAI y reducir las pérdidas económicas y la transmisión zoonótica, sin embargo, la vacunación no es una práctica común en granjas avícolas porque no se considera una opción viable. Además, si la vacunación se adoptara en una situación de emergencia, posiblemente ocurriría después de que ya se haya identificado un brote. La protección de la vacuna tarda de dos a tres semanas en adquirirse (Kim et al 2009), y a menudo requiere dosis repetidas para inducir una protección completa (Poetri et al 2011). Por lo tanto, la vacunación durante un brote puede hacer poco para controlar la cadena de transmisión, especialmente en áreas de aves de corral densamente pobladas. El desarrollo de una tecnología antigripal potente para aves de corral es un paso crítico para gestionar y controlar eficazmente la propagación de esta enfermedad a nivel mundial.

[0030] El trabajo previamente descrito investigó la inhibición del AIV en células epiteliales de pollo usando la plataforma de transferencia de ARNi, tkRNAi. Este sistema tkRNAi usa una *E. coli* diseñada para producir ARN en horquilla corto contra los genes virales NP y PA y transfirió exitosamente el ARNhc intracelularmente. En las veinticuatro horas tras la administración, estos vectores llevan a reducciones significativas en la replicación del AIV *in vitro*. Estos procedimientos demostraron el potencial antivirico transitorio de estos novedosos vectores anti-AIV en nuestro modelo de tejido aviar. En la búsqueda continua de nuestro objetivo a largo plazo para desarrollar esta tecnología antigripal en un profiláctico que contribuya al desarrollo de un método de control más eficaz y robusto para el AIV en aves de corral, el objetivo del presente estudio es evaluar la administración intranasal y la eficacia protectora de estos vectores antiviricos en pollos inoculados experimentalmente.

[0031] La eficacia de la vacuna se evalúa basándose en la protección clínica (morbilidad y mortalidad reducidas) y a través de la detección de la diseminación de virus después de la exposición. Un objetivo adicional de la vacunación de AIV en aves de corral es estimular una respuesta inmunitaria y evitar que el animal individual se infecte. Este profiláctico no está diseñado para evitar la infección en el animal individual. El modo de acción de novedosa esta tecnología es la inhibición de la replicación viral, reduciendo así la diseminación de virus infeccioso tras la infección.

[0032] Teóricamente, si un pollo está diseminando cantidades inferiores de virus, la carga viral se reduce y es más probable que el animal esté clínicamente protegido. Por lo tanto, para proporcionar una eficacia inicial para estos vectores anti-AIV, se evaluó la capacidad profiláctica de estos vectores para reducir la morbilidad, la mortalidad y la diseminación viral en pollos experimentalmente inoculados. Si este profiláctico puede inhibir la proporción de aves con diseminación y los títulos de diseminación en el ave individual, se controlará mejor el riesgo de transmisión entre poblaciones de aves. Por lo tanto, además de supervisar la proporción de aves con diseminación y los títulos

de diseminación, el potencial para la transmisión se ha evaluado usando aves centinela alojadas entre las aves inoculadas con AIV que recibieron los vectores anti-AIV (véase el ejemplo 3, a continuación).

5 [0033] Las aves de corral tratadas con los vectores anti-AIV no desarrollarían anticuerpos contra el AIV. Esto es típicamente una limitación asociada a las prácticas de vacunación porque la vacuna estimula la producción de anticuerpos contra el virus. Esto crea problemas relacionados con las barreras comerciales, haciendo que sea difícil distinguir la reactividad de anticuerpos debido a la vacunación frente a la infección de AIV natural. Si una vacuna convencional eficaz está disponible, a menudo no se puede usar. Un país no puede arriesgar perder el estado sin enfermedad de AIV, que es a menudo el caso cuando las pruebas serológicas positivas debido a la vacunación interfieren con la vigilancia de la enfermedad. A diferencia de las aves de corral vacunadas, aquellas tratadas con los vectores anti-AIV no serían positivas para los anticuerpos de AIV y no requerirían análisis adicionales usando el ensayo de diferenciación entre infectados y vacunados (DIVA). De esta manera, se evitarían las barreras comerciales asociadas a la reactividad de los animales vacunados y las pruebas de cribado adicionales para el AIV.

15 [0034] La industria avícola no adoptará una vacuna comercial o ningún otro profiláctico sin demostrar que su uso es una contramedida rentable frente a brotes de AIV. Esto es especialmente crítico en áreas avícolas de baja densidad donde el riesgo de un brote es percibido como insignificante. Los factores que afectan el coste de vacunación incluyen el tiempo de conservación o la sostenibilidad de la vacuna, el método de administración, la facilidad con la cual se puede generar y la accesibilidad. Generalmente, el beneficio debe ser superior al coste de la vacunación o el tratamiento para ser visto como una buena inversión.

20 [0035] Una de las limitaciones asociadas a otros métodos terapéuticos de ARNi es el coste asociado a la fabricación comercial del ARN de silenciamiento. Una ventaja obvia de la tecnología propuesta es la capacidad de las bacterias mismas de producir el ARNhc para la escisión en las secuencias de ARNip posteriores. Esta característica elimina la costosa fabricación de ARNip y los altos costes de producción (Xiang et al 2009, Keates et al 2008, Xiang et al 2006, Gardlik et al 2005). En áreas donde las vacunas se consideran necesarias, los países acumularán millones de dosis de vacuna cada año para la preparación frente a emergencias. Muchas veces estas vacunas se vuelven obsoletas cuando se descubre que son distantes del virus de campo. Es simple y rápido generar grandes cantidades de bacterias. Por lo tanto, a diferencia de una vacuna que puede tardar meses en formularse e incluso más tiempo en adquirirse en cantidades suficientes, estos vectores podrían ser generados fácilmente en cantidades masivas a partir de un *stock* pequeño. Si se almacena debidamente, estos vectores bacterianos podrían tener un tiempo de conservación indefinido. Esta es otra ventaja principal sobre las vacunas actuales.

30 [0036] La vacunación y otros enfoques de ARNi tienen su cuota de impedimentos relacionados con la administración y la transferencia dirigida. La mayoría de las vacunas de AIV deben administrarse subcutáneamente, lo que las hace incómodas e ineficientes de administrar. Estos vectores anti-AIV permiten la transferencia respiratoria dirigida y la invasión específica en las células epiteliales mucosas que expresan β 1-integrinas. A diferencia de otros tejidos y órganos, los tejidos respiratorios, incluidos los pulmones, son increíblemente accesibles, lo que hace que esta tecnología anti-AIV sea ideal para prevenir enfermedades respiratorias como la gripe. Los pollos tienen una glándula situada medial al ojo llamada la glándula de Harder, y se piensa que esta glándula es crítica para desarrollar una respuesta inmunitaria local en la vía respiratoria superior (Wight et al 1971). Por esta razón, se cree que las vacunaciones mediante gotas para los ojos estimulan una reacción inmunitaria mucosa a través de la glándula de Harder y lo mismo puede decirse si estos vectores se administraran en el ojo. Los vectores anti-AIV podrían ser fácilmente enmendables para administrar por vía intranasal, por vía oral, por vía de gotas para los ojos o como un aerosol pulverizado adecuado para la inhalación o la transferencia ocular.

45 [0037] Estos vectores representarían un producto rentable sostenible fácilmente disponible para la aplicación a gran escala en una operación avícola comercial. La versatilidad de transferencia y la facilidad con la cual podría ser enmendable para la aplicación a gran escala da a esta tecnología una ventaja sobre las vacunas actuales y equivale a un sistema que proporciona una transferencia eficiente y la localización en tejidos pulmonares. Estas cualidades hacen que esta tecnología sea especialmente ventajosa durante una situación de brote para reducir la diseminación y la transmisión del virus entre las poblaciones de aves de corral.

50 [0038] La eficacia es una característica esencial de una vacuna del AIV o un profiláctico alternativo ideales para aves de corral. El término eficaz se utiliza para determinar si una vacuna o un profiláctico alternativo es protector en estudios de exposición experimental estandarizados, según se mide por prevención de la mortalidad, la morbilidad, la diseminación y la transmisión del AIV entre las aves de corral. Los estándares de la industria para la eficacia de las vacunas con HPAI son una morbilidad y una mortalidad reducidas. Se observa muy poca morbilidad y mortalidad en pollos SPF inoculados con LPAI experimentalmente, haciendo que sea difícil determinar la eficacia de la vacuna para aislados de LPAI. La cuantificación de los títulos orofaríngeos de los pollos es como se determina rutinariamente la eficacia para las vacunas contra los aislados de LPAI. Debido a que las vacunas actualmente disponibles para aves de corral no proporcionan inmunidad esterilizante, una herramienta de control eficaz debería ser reducir la diseminación del virus en la mayor medida posible (Sylte y Suarez 2012). Los resultados de estos estudios piloto iniciales indican que el tratamiento con el vector anti-AIV reduce los títulos de diseminación y

replicación del virus a niveles considerados clínicamente relevantes. Sin embargo, es necesario realizar estudios adicionales para demostrar adicionalmente la naturaleza protectora de esta tecnología.

[0039] La vacunación para el AIV en aves de corral es más difícil que la vacunación usada contra la mayoría de los otros virus causantes de enfermedades. Esto se debe a grandes variaciones antigénicas que requieren conocimientos previos de los subtipos circulantes, lo que reduce la eficacia de la vacuna. La baja eficacia de la vacuna y las altas proporciones coste-beneficio compensan normalmente cualesquiera políticas de vacunación propuestas. Cuando el AIV se detecta en aves de corral, generalmente se usa una política de 'erradicación' o sacrificio en los esfuerzos para erradicar la enfermedad. Suponiendo que se demuestren eficacia, potencia y seguridad ambiental en futuros estudios de exposición y pruebas de campo aleatorizadas, imagino que esta tecnología profiláctica podría ser una solución al sacrificio preventivo de aves de corral en áreas de alto riesgo. Sin embargo, incluso cuando la vacunación se selecciona como una herramienta de emergencia durante los brotes, es a menudo conjuntamente con otros métodos de control, especialmente si el sacrificio rápido es difícil. Las experiencias previas han indicado que para tener éxito en el control y, en última instancia, en la erradicación del AIV, los programas de vacunación deben ser parte de una estrategia de control más amplia (Capua y Marangon 2006). Esto incluye medidas de bioseguridad estrictas, vigilancia, sacrificio y posiblemente la implementación del uso de esta tecnología profiláctica.

[0040] Otra cuestión relacionada con la eficacia es el intervalo de tiempo necesario para obtener inmunidad protectora. Se requieren un mínimo de 7 a 10 días para estimular una respuesta inmunitaria inicial tras la vacunación y otras 2 semanas para generar niveles de anticuerpos protectores. Esto implica que, aunque el proceso de toma de decisiones sea acelerado y una vacuna apropiada esté disponible para un uso inmediato, la vacunación puede no ser eficaz si se aplica durante un brote activo en aves de corral. Un beneficio clave que tendría sobre la vacuna esta tecnología de vector anti-AIV es su capacidad para proporcionar una protección transitoria. Esta característica sería increíblemente ventajosa durante una situación de brote.

Ejemplo 1 - Diseño de ARNip y uso de ARNip específicos virales para inhibir la gripe aviar en un modelo de tejido aviar.

[0041] El virus de la gripe aviar (AIV) representa una de las amenazas económicas más significativas para las aves de corral a nivel mundial. Las vacunas para el AIV son limitadas, lo que resalta la necesidad de considerar nuevas estrategias profilácticas que puedan proteger las aves de corral contra los brotes. Se desarrollaron una transfección de tejido aviar y un modelo de infección de AIV apropiados. Este modelo aviar fue usado para demostrar el potencial antivírico de un ARN pequeño interferente ("ARNip") que reconoce dos genes clave del AIV requeridos para la replicación viral; NP y PA. Se transfectaron células LMH de pollo con ARNip que reconocen ARNm de NP y PA y las células fueron infectadas con dos subtipos de LPAI diferentes, el H8N4 y el H6N2. El análisis de regresión lineal multivariante, controlando el día, reveló diferencias significativas en los títulos de diseminación medios ajustados entre muestras tratadas con ARNip y aquellas no tratadas ($p < 0,05$). Los ARNip individuales y los cócteles de ARNip evaluados llevaron a una reducción de hasta 100 veces en los títulos de diseminación en los sobrenadantes de las células LMH de pollo ($p < 0,05$). Este trabajo demuestra una prueba de concepto *in vitro* usando ARNip específicos virales para inhibir la replicación de la gripe aviar en el modelo de tejido aviar establecido.

MATERIALES Y MÉTODOS

[0042]

Cultivos celulares - Se eligieron células epiteliales de carcinoma hepatocelular de pollo (células LMH, ATCC CRL-2117) como la línea celular del modelo aviar. Estas células están disponibles comercialmente, específicamente destinadas a estudios de transfección y, como hepatocitos epiteliales, representan un tejido aviar apropiado para la infección gripal de tipo A (Swayne y Pantin-Jackwood 2006, Shinya et al 1995). Las células LMH se cultivaron en medio Waymouth's MB 752/1 (Life Technologies), con un 10% de suero bovino fetal (FBS, Life Technologies), 2 mM de L-glutamina (Life Technologies), 100 unidades/ml de penicilina y 1 mg/ml de estreptomina (Life Technologies) a 37°C en presencia de un 7% de CO₂. Todos los recipientes de cultivo usados para propagar las células LMH se recubrieron previamente con gelatina al 0,1% (Millipore). Se usaron células renales caninas Madin-Darby (MDCK) para determinar los títulos virales y para cuantificar las partículas virales infecciosas tras todos los ensayos de transfección y de infección llevados a cabo en las células LMH. Las células MDCK se cultivaron en medio esencial mínimo con sales equilibradas de Earle (MEM/EBSS), 2 mM de L-glutamina, 10% de suero bovino fetal (FBS), 0,5% de piruvato de sodio (solución de 100 mM, Life Technologies), 0,5% de aminoácidos no esenciales MEM (NEAA, solución 100x, Life Technologies) y 100 unidades/ml de penicilina y 1 mg/ml de estreptomina (Life Technologies) a 37°C en presencia de un 7% de CO₂.

Virus - Las siguientes cepas del virus de la gripe aviar LPAI fueron propagadas en células LMH: A/Chicken/Texas/473-2/10 (H6N2), A/Chicken/Texas/55116-2/11 (H4N8) y el subtipo H8N4 de la LPAI aislado de un brote en pavos en Colorado, 2005 (el subtipo fue determinado previamente por inhibición de la hemaglutinación y paneles de inhibición de neuraminidasa). Los títulos de virus fueron medidos por el ensayo del 50% de la dosis infecciosa de cultivo de tejido (TCID₅₀) en células MDCK. Se eligieron las cepas H6N2 y H8N4 de la LPAI para el estudio porque se replicaron a altos títulos en células LMH con un fuerte efecto citopático (CPE) en las 48 horas posteriores a la infección (hpi) y son adecuadas para los ensayos de TCID₅₀ usando células MDCK. Ambos virus se propagaron en células LMH y se recogieron los sobrenadantes virales infecciosos, se centrifugaron para eliminar los restos celulares y se almacenaron a -80°C. Un título de *stock* de trabajo fue medido por TCID₅₀ y se determinó la multiplicidad de infección (MOI) óptima.

ARNip - Se sintetizaron oligonucleótidos de ARN, se desalaron y se duplicaron antes de enviarlos (Dharmacon, Thermo Scientific). Las secuencias de ARN sentido y antisentido para NP (ARNip-NP) y PA (ARNip-PA) fueron publicadas previamente (Ge et al 2003). La secuencia diana de ARNm para cada ARNip son las siguientes: NP: 5'- GGA TCT TAT TTC TTC GGA G - 3' (SEQ ID NO. 1) y PA: 5' -GCA ATT GAG GAG TGC CTG A - 3' (SEQ ID NO. 2). Se usó BLAST para verificar que cada secuencia de la cadena sentido del ARNip era 100% complementaria a las secuencias génicas virales de NP y PA asociadas a H6N2 y H8N4. Adicionalmente, todas las secuencias de la región semilla antisentido de ARNip se cribaron en busca de secuencias de pollo de alta homología para reducir la posibilidad de silenciamiento inespecífico.

Eficiencia de transfección - Varios reactivos de transfección fueron evaluados para señales visuales de CPE independiente del ARNip. Estos incluyen Lipofectamine® 2000 (Life Technologies), Lipofectamine® RNAiMax (Life Technologies), FuGene® 6 (Promega Corporation) y XtremeGene (Roche Diagnostics). Los rendimientos de transfección fueron determinados en células LMH usando BLOCK-iT™ Alexa Fluor® Red Fluorescent dsRNA Control (Life Technologies). Las células positivas para Alexa Fluor® fueron contadas en ocho campos oculares aleatorios a 40X usando el microscopio fluorescente confocal LSM 510 Zeiss. Se usó la microscopía fluorescente para seleccionar el reactivo de transfección final, determinar el rango de concentración óptimo de ARNip y reactivo de transfección y el periodo de incubación de ARNip óptimo. La eficiencia de transfección ($\alpha = 0,05$) fue determinada después de 24 h de incubación.

Transfección de ARNip en células de pollo - Las células LMH fueron sembradas un día antes de la transfección en placas de 24 pocillos para permitir que las monocapas celulares alcanzasen un 80% de confluencia. Las células fueron transfectadas con ARNip-NP, ARNip-PA y ambos NP/PA (ARNip-cóctel) (32 nM individualmente o 64 nM en total en un formato de cóctel) usando Lipofectamine® 2000 según la instrucción del fabricante. Brevemente, se diluyó Lipofectamine® 2000 1:50 en medio Opti-MEM (Life Technologies). Cada ARNip de prueba y ARNip simulado (ARNip negativo aleatorio sin complementariedad con ningún gen de pollo conocido) se diluyó posteriormente en la mezcla de Lipofectamine® 2000 - Opti-MEM y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Las células LMH fueron preparadas para la transfección eliminando el medio de crecimiento completo y lavando cada pocillo solo con medio Opti-Mem. El lavado fue sustituido con 687 µl/pocillo de medio de transfección (Opti-MEM, 10% FBS, 2 mM de L-glutamina) y se añadieron 63 µl de complejo ARNip-Lipofectamine® 2000. Todas las células de control o tratadas fueron transfectadas en pocillos por triplicado.

Infección de virus - Veinticuatro horas después de la transfección las células LMH fueron preparadas para la infección eliminando el medio de transfección y lavando cada pocillo con medio de inoculación (IM) con 0,25 µg/ml de tripsina tratada con TPCK (Sigma-Aldrich), un 3% de albúmina de suero bovino (BSA, Gemini Bio-Products), 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina y 1 mg/ml de estreptomina. El lavado fue eliminado y se añadieron un total de 250 µl de IM con o virus H8N4 o H6N2 con una MOI de 0,01 o 0,001 a cada pocillo apropiado. Las placas fueron incubadas en una plataforma basculante a 37°C en presencia de un 7% de CO₂ durante 1 hora antes de eliminar el virus y reemplazarlo con 750 µl/pocillo de IM fresco. A las cuarenta y ocho hpi se cosecharon los sobrenadantes de los cultivos celulares, se centrifugaron para eliminar los restos celulares y se congelaron a -80°C. Cada experimento incluía un control positivo (solo infectadas con LPAI), un control negativo (células LMH no tratadas) y un control de transfección de simulación (ARNip simulado e infectadas con LPAI) evaluados en pocillos por triplicado.

Evaluación del título de virus infeccioso - Los sobrenadantes de los cultivos celulares de LMH fueron cuantificados por titulación en células MDCK usando el CPE como el indicador de presencia viral, y el título fue expresado como el 50% de la dosis infecciosa de cultivo de tejido/ml (TCID₅₀/ml). Brevemente, las células MDCK fueron sembradas en placas de 96 pocillos. Para cada sobrenadante de cultivo, se realizaron diluciones en serie con un factor de diez de 1:10 a 1:10⁸ en MEM/EBSS, 2 mM de L-glutamina, 3% de BSA, 0,5% de piruvato de sodio, 0,5% de MEM-NEAA, 100 U/ml de penicilina y 1 mg/ml de estreptomina, con 1 µg/ml de tripsina tratada con TPCK (Worthington Biochemical Corporation). Cuando las monocapas celulares tenían un 80-90% de confluencia, se eliminó el medio de crecimiento y las células fueron inoculadas con 100 µl/pocillo de suspensión de virus por triplicado. A las 48 hpi las células fueron incubadas con tinte violeta cristal (violeta

crystal al 0,1% y formalina tamponada con PBS al 2,5% en suero salino tamponado con fosfato (PBS)) y los pocillos con CPE se marcaron como positivos para el crecimiento del virus. La TCID₅₀/ml se calculó mediante la técnica matemática de Reed y Muench (Reed y Muench 1938).

5 Análisis estadístico - Todos los experimentos se repitieron un mínimo de tres veces, en días diferentes. Usando un nivel de significación estadística de 0,05, se realizó la prueba de la suma de rangos de Wilcoxon para comparar los títulos virales medios entre las muestras de ARNip transfectado y las de control positivo (PC) realizadas en el mismo día. Para determinar si los valores de LogTCID₅₀/ml medios ajustados entre las muestras transfectadas con ARNip y las PC fueron estadísticamente diferentes ($p < 0,05$), los datos se analizaron usando la regresión lineal multivariante, controlando el día. Los análisis estadísticos se realizaron usando el *software* informático Stata 10 (Statcorp LP).

10

RESULTADOS

[0043] Diseño de ARNip eficaces - El amplio rango de variación genética entre diferentes cepas de virus de gripe aviar es responsable en gran medida de la evasión viral después de la vacunación no específica. Asimismo, esta variabilidad genética hace difícil diseñar ARNip que puedan permanecer eficaces contra múltiples AIV. Tan poco como una diferencia de un nucleótido entre el sitio diana de ARNm y la región semilla antisentido del ARNip puede abolir completamente cualquier actividad antivírica de ARNi. Por lo tanto, resulta importante diseñar ARNip que reconozcan secuencias altamente conservadas observadas en muchas cepas diferentes, incluidos los virus de la HPAI. Se usó BLAST para buscar homología de secuencias en virus de la gripe de tipo A al igual que coincidencias inespecíficas entre las secuencias de ARNip de NP y PA y secuencias de pollo. Este cribado reveló que ninguno de los ARNip tenía una alta homología con cualquiera de las secuencias de pollo conocidas, específicamente entre la región semilla del ARNip y el ARNm huésped. Las secuencias de ARNip de NP y PA ambas se alinearon contra las secuencias de NP y PA del H8N4 y el H6N2 con una homología del 100%. Usando la base de datos de colección de nucleótidos (nr/nt) para ambas secuencias de ARNip de 19 nt, la búsqueda de BLAST revela una cobertura del 100% de la secuencia de consulta en más de 10.000 virus de la gripe de tipo A, incluidos aquellos aislados de cerdo, aves salvajes, aves de corral, equinos, caninos y seres humanos. Estas coincidencias con la secuencia de consulta incluyen los subtipos patógenos H5, H9 y H7 aislados tan recientemente como en el 2013 de brotes nacionales e internacionales.

15

20

25

[0044] Actividad antivírica de ARNip en células de pollo - El procedimiento de transfección fue optimizado para conseguir hasta un 81% de tasa de transfección en células LMH usando una concentración de Lipofectamine® 2000 y ARNip de entre 32 nM y 64 nM. Este procedimiento de transfección y rango de concentración de ARNip permitió la transfección adecuada, sin inducir un CPE. Antes de la infección con virus H6N2 o H8N4 con una MOI de 0,01 y de 0,001, ARNip-NP y PA se transfectaron en células LMH y los sobrenadantes de cultivos se recogieron para el análisis de la TCID₅₀. La falta de diferencias significativas en el título de virus entre los controles simulados y los PC (datos no mostrados) indican que la transfección de ARNip no afectó la producción de virus.

30

[0045] Como se esperaba, la actividad antivírica de cada transfección de ARNip varía por día, virus y MOI usada para la infección (FIG. 1). Sin embargo, se observa una actividad antivírica significativa en muestras de ARNip-NP, PA o cóctel de infecciones tanto de H6N2 como de H8N4. En cada día experimental, al menos una transfección de ARNip redujo significativamente los títulos medios de virus en ambos virus y en ambas MOI, en comparación con las muestras PC correspondientes. En al menos un día experimental, el ARNip-cóctel redujo significativamente los títulos medios de virus en ambos virus y en ambas MOI, excepto el H8N4 con una MOI de 0,001. A pesar de una falta de diferencias significativas posiblemente asociada a un tamaño de muestra pequeño, un 70%, un 50% y un 100% de todas las transfecciones de ARNip-NP, ARNip-PA y ARNip-cóctel resultaron en títulos virales medios inferiores en comparación con sus PC no tratados apropiados, respectivamente.

35

40

[0046] Para comparar ARNip transfectado con muestras PC no tratadas a lo largo de todos los días experimentales, se usó un análisis de regresión lineal multivariante (MLR), controlando el día. Los resultados de MLR revelan diferencias significativas en los títulos virales medios ajustados entre las muestras transfectadas con ARNip y las PC no tratadas (tabla 1). Se observan diferencias significativas tanto en las muestras de ARNip-NP como en las de ARNip-cóctel de las células infectadas con H8N4 MOI 0,01 y con H6N2 MOI 0,001. Se calculó la reducción log₁₀ en el virus infeccioso entre las muestras transfectadas con ARNip y no tratadas. Con la excepción de la transfección de ARNip-PA de las muestras H8N4 MOI 0,001 y H6N2 MOI 0,01, todas las transfecciones de ARNip resultaron en al menos una reducción log₁₀ de 0,3 (factor de reducción de 2,1). Más notables fueron los títulos de H8N4/MOI 0,01 después de la transfección de ARNip-cóctel, los títulos de H8N4/MOI 0,001 después de la transfección de ARNip-NP y los títulos de H6N2/MOI 0,001 tras las transfecciones de ARNip-cóctel y NP, dando como resultado una reducción log₁₀ de 1,3 (20 veces), 1,0 (10 veces) y 1,7 (50 veces), 2,0 (100 veces), respectivamente.

45

50

55 Tabla 1 - Protección de ARNip en células epiteliales de pollo según se mide por reducción log y factor de reducción en los títulos de diseminación.

Muestra	Media ajustada ^a	95% CI	Media ajustada (no tratada)	95% CI (no tratada)	valor P ^b	reducción log ^c	factor de reducción ^d
Virus de LPAI H8N4 MOI 0,01							
ARNip-NP	4,1	(3,4; 4,8)	5,0	(4,3; 5,7)	0,01 0	0,9	7,9
ARNip-PA	5,5	(4,5; 6,5)	5,8	(4,8; 6,8)	0,54 7	0,3	2,0
ARNip-cóctel	3,7	(3,1; 4,3)	5,0	(4,4; 5,6)	< 0,00 1	1,3	20,0
Virus de LPAI H8N4 MOI 0,001							
ARNip-NP	7,5	(6,4; 8,7)	8,5	(7,6; 9,4)	0,08 8	1,0	10,0
ARNip-PA	8,6	(7,3; 10,0)	8,5	(7,5; 9,6)	0,89 2	-0,1	0,8
ARNip-cóctel	8,3	(7,1; 9,4)	9,0	(8,1; 9,9)	0,19 0	0,7	5,0
Virus de LPAI H6N2 MOI 0,01							
ARNip-NP	6,3	(5,5; 7,2)	6,6	(5,7; 7,5)	0,44 3	0,3	2,1
ARNip-PA	7,5	(6,7; 8,2)	6,9	(6,1; 7,7)	0,10 9	-0,6	0,3
ARNip-cóctel	5,8	(4,9; 6,6)	6,3	(5,5; 7,1)	0,18 8	0,5	3,2
Virus de LPAI H6N2 MOI 0,001							
ARNip-NP	8,4	(7,2; 9,7)	10,4	(9,5; 11,4)	0,00 4	2,0	100,0
ARNip-PA	10,0	(8,4; 11,7)	10,4	(9,2; 11,7)	0,61 5	0,4	2,5
ARNip-cóctel	8,7	(7,4; 10,0)	10,4	(9,4; 11,5)	0,01 2	1,7	50,1

Los resultados son de regresión lineal multivariante, controlando el día. ^a Expresado como LogTCID₅₀/mL medio ajustado. ^b Comparación del LogTCID₅₀/mL medio ajustado de muestras PC tratadas con muestras no tratadas (p<0,05). ^c Reducción log en el título infeccioso medio en comparación con el control no tratado. ^d Factor de reducción en la media geométrica en comparación con el control no tratado.

5 [0047] Este ejemplo demuestra una prueba de concepto *in vitro* usando ARNip específicos virales para inhibir la gripe aviar en un modelo de tejido aviar. La transfección de células LMH de pollo con ARNip que reconocen ARNm de NP y PA redujo significativamente los títulos infecciosos tras la infección con dos subtipos diferentes de AIV, H8N4 y H6N2. Ambos de estos virus no son virus de LPAI adaptados al laboratorio. Ambos fueron aislados de brotes pasados en aves de corral, que ocurrieron en los Estados Unidos. Como tales, son virus apropiados e ideales para probar este enfoque de ARNip antivírico.

10 [0048] Incluso cuando no se observó una diferencia significativa entre transfección de ARNip y muestras PC no tratadas, se observaron reducciones log₁₀ en los títulos virales infecciosos en todas las muestras de ARNip, excepto en dos conjuntos de transfección de ARNip-PA. La inhibición más potente de los títulos virales infecciosos ocurrió después de que las células LMH fueran transfectadas con o ARNip-NP o ARNip-cóctel, resultando en reducciones log₁₀ que varían de 0,5 - 2,0 (factor de reducción de 3,2 - 100).

15 [0049] Este trabajo proporciona una base para definir medidas que causen una protección de ARNip suficiente que evite la diseminación del virus y la posterior transmisión de la enfermedad durante un brote de AIV en aves de corral. Adicionalmente, los virus de la gripe mutan rápidamente, a menudo haciendo que las vacunas se vuelvan inefectivas. El diseño de constructos de ARNi que reconocen estos sitios de ARNm conservados podría permitir un silenciamiento por ARNi más eficiente, pero, además, el reconocimiento de múltiples sitios conservados usando estos cócteles de ARNip podría además evitar el escape del ARNi por mutación.

20 [0050] El ARNi es una herramienta que puede ayudar a los investigadores a conseguir lo que no ha sido aún posible y proporcionar una oportunidad para una nueva estrategia de desarrollo antigripal. Este estudio fue exitoso en el desarrollo de un modelo aviar *in vitro* apropiado para validar este enfoque antigripal de ARNi. Este trabajo mostró que el silenciamiento mediado por ARNip que reconoce los genes virales tanto NP como PA, en un formato de cóctel, inhibe la replicación del AIV *in vitro*. Sin embargo, a pesar del potencial que estos ARNip tienen para inhibir la diseminación de virus infeccioso en este modelo aviar, estos agentes de mediación de ARNi requieren un mejor mecanismo de transferencia para ser considerados clínicamente aplicables. La eficiencia de transferencia asociada al uso de un vehículo de transfección sintético, tal como Lipofectamine® 2000, es limitado por varias razones. Primero, los bajos rendimientos de transferencia requieren dosis más altas, que no solo tienen costes prohibitivos, sino que son a menudo tóxicas (Ge et al 2004). Segundo, estos reactivos de transfección solo consiguen una transferencia sistémica, no una transferencia dirigida. Esto requiere de nuevo dosis más altas para transfectar suficientemente un tejido específico. El desarrollo de una tecnología antivírica de ARNi que permitiera la transferencia intranasal sería prometedora únicamente para la prevención del AIV. En consecuencia, un trabajo posterior se enfocó en diseñar un mejor mecanismo de transferencia para este antivírico a base de ARNi, específicamente para la prevención del AIV en aves de corral. Este trabajo se presenta a continuación en el ejemplo 2.

Ejemplo 2 - Inhibición de la replicación de la gripe aviar en un modelo celular de pollo usando una tecnología de transferencia de ARNi única

[0051] Los incentivos económicos para vacunar aves de corral contra el AIV son bajos y a menudo debidos a varias limitaciones de la vacuna. Estas limitaciones y falta de incentivo plantean impedimentos significativos para controlar eficazmente los brotes de AIV en aves de corral. El desarrollo de una nueva tecnología antigripal es un paso crítico hacia la gestión y el control eficaces de la propagación de esta enfermedad en aves de corral, la minimización de las pérdidas financieras y la reducción del riesgo de transmisión a otros animales, incluidos seres humanos. La aplicación de metodologías de ARNi para desarrollar un antivírico alternativo contra el AIV es una posibilidad. Sin embargo, la transferencia de agentes de mediación de ARNi sigue siendo un obstáculo para aprovechar su aplicación clínica. El ARNi transkingdom (tkRNAi) usa bacterias no patógenas para generar y transferir ARNi a tejidos diana, y podría ser la clave para lograr la aplicación clínica de un enfoque de ARNi. Se construyeron vectores TkRNAi (vectores anti-AIV) para generar un ARNi que reconoce los genes virales, NP o PA, y la eficacia protectora de estos vectores se evaluó en el modelo de tejido aviar establecido. También se emplearon combinaciones de vectores ("cóctel") para investigar el efecto aditivo de reconocer múltiples ARNm del AIV. La captación y la invasión del vector se verificó primero en células LMH de pollo tratadas con vectores marcados con una proteína fluorescente roja. A continuación, las células fueron tratadas con los vectores anti-AIV e infectadas con dos subtipos diferentes de LPAI, H8N4 y H6N2. El análisis de regresión lineal multivariante, controlando el día, reveló diferencias significativas en los títulos de diseminación medios ajustados entre muestras tratadas con los vectores anti-AIV y aquellas no tratadas ($p < 0,05$). Los cócteles de vectores que reconocen tanto los genes NP como PA proporcionaron un factor de reducción de hasta 10.960 en los títulos de diseminación en los sobrenadantes de células LMH de pollo ($p < 0,05$). Este trabajo demuestra una prueba de concepto *in vitro* para el uso de estos novedosos vectores anti-AIV para inhibir el AIV en el modelo de tejido aviar establecido. Este trabajo representa el primer caso de este tipo para usar el sistema tkRNAi en un modelo aviar y para inhibir la replicación de la gripe.

MATERIALES Y MÉTODOS

[0052] Cultivos celulares - Basándose en el trabajo previo del ejemplo 1, se usaron células epiteliales de carcinoma hepatocelular de pollo (LMH) y células renales caninas Madin-Darby (MDCK) para todos los ensayos de invasión e infección, y de título viral, respectivamente. Las células se mantuvieron en medio de crecimiento apropiado, tal y como se ha descrito anteriormente, con ligeras modificaciones. Para minimizar la inactivación del complemento del huésped de los vectores anti-AIV durante el paso de invasión, las células LMH se cultivaron continuamente en medio con FBS inactivado por calor (Life Technologies). Esto se hizo para evitar la posible activación de la vía alternativa del complemento en respuesta a la presencia de bacterias, que lleva a la inactivación de los vectores bacterianos antes de la captación intracelular.

[0053] Virus - Las siguientes cepas del virus de la gripe aviar LPAI se eligieron para usarse en todos los estudios de invasión e infección: A/Chicken/Texas/473-2/10 (H6N2) y el subtipo H8N4 de la LPAI aislado de un brote de pavo en Colorado, 2005. Se midieron los títulos virales para cada LPAI por ensayo TCID₅₀. Ambos virus se replican a altos títulos en las células LMH con un CPE a las 48 horas posteriores a la infección (hpi). Tal y como se ha descrito anteriormente, se generaron *stocks* y se eligieron las MOI óptimas.

[0054] Validación de la integrina beta-1 en células de pollo - Debido a que los tejidos aviares son una diana novedosa para tkRNAi, era importante validar la presencia de los receptores de integrina $\beta(1)$ en la superficie de las células LMH en condiciones normales (no infectadas) y después de la infección con AIV. Se extrajo el ARN total (E.Z.N.A.® Total RNA Kit I, Omega Bio-Tek) de cultivos de células LMH que no estaban infectados (condiciones de crecimiento normales) y de cultivos a las 6 y 24 horas posteriores a la infección con el virus H8N4. Se sintetizó el ADNc de la primera cadena a partir de 0,75 μ g de ARN total usando Oligo(dT) Primer (Promega) y la síntesis de ADNc se completó utilizando 4mM de los dNTP y el kit AffinityScript Multiple Temperature Reverse Transcriptase (Stratagene), según las recomendaciones del fabricante. El gen constitutivo, β -actina, se usó como un control interno para la expresión de la integrina $\beta(1)$ en las células LMH. Cebadores para la β -actina y la $\beta(1)$ integrina se publicaron previamente (Caprile et al 2009) usando secuencias de pollo de GenBank. La amplificación por PCR convencional fue completada usando una reacción de 25 μ l con: 2,5 μ l de ADNc, 0,8 mM de los dNTP, 1,6 mM de MgCl₂, 2,5 μ l de 10X Amplitaq Gold Buffer® II, 0,8 U de Taq ADN polimerasa (Applied Biosystems) y 0,4 μ M de cebadores directo e inverso. Cada reacción se cubrió con 30 μ l de cera Chill Out® (Bio-Rad) para evitar la evaporación y se colocó en un termociclador MJ Research 60 place (Bio-Rad). La mezcla de reacción por PCR se incubó a 95°C durante 10 minutos y 35 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 57°C durante 60 segundos y 72°C durante 20 segundos. El producto de la PCR se analizó por electroforesis en gel de agarosa usando el sistema FlashGel® DNA System (Lonza Group Ltd). Los productos amplificados se visualizaron por transiluminación de luz UV y se corrió una escalera de pesos moleculares de 100 pares de bases (bp) (Lonza Group Ltd) en los geles para ayudar en el cálculo del tamaño de los fragmentos de ADN amplificados. El tamaño de banda previsto para la β -actina y la $\beta(1)$ integrina era de 282 y 308 pares de bases, respectivamente.

[0055] Construcción y generación de vectores de ARNhc tkRNAi - El vector de expresión de ARNhc, pmbv43, se ha descrito previamente (Buttaro y Fruehauf 2010). El pmbv43 contiene un casete de expresión dirigido por el promotor T7 con sitios de clonación que contienen secuencias de las enzimas de restricción BamHI y Sall. Tras la recepción del plásmido parent_pmbv43 de Cambridge Biolabs (Cambridge, MA), el plásmido fue digerido 2 horas a 37°C en una reacción de 50 µl con: 2 µg de pmbv43, 2,0 µl de BamHI (New England Biolabs (NEB)), 2,0 µl de Sall (NEB), 5,0 µl de Buffer 3 (NEB), 0,5 µl de albúmina de suero bovino 100X (NEB) y 24,2 µl de agua molecular. El parent_pmbv43 digerido fue tratado posteriormente con fosfatasa alcalina, intestinal de ternero (NEB) y precipitado con fenol/cloroformo y etanol. El plásmido parent_pmbv43 lineal de 8,4 kb resultante fue extraído en gel a partir de un 1% de gel de agarosa después de la electroforesis en gel y aislado usando diálisis.

[0056] El ARNi que reconoce la secuencia de NP fue 5' - GGA TCT TAT TTC TTC GGA G - 3' (SEQ ID NO. 1) y PA fue 5' - GCA ATT GAG GAG TGC CTG A - 3' (SEQ ID NO. 2). La secuencia complementaria/antisentido para NP fue 5' - CTC CGA AGA AAT AAG ATC C - 3' (SEQ ID NO. 3) y la secuencia complementaria/antisentido para PA fue 5' - TCA GGC ACT CCT CAA TTG C - 3' (SEQ ID NO. 4). El molde de ADN que codifica el ARNhc específico para NP y PA fue: sitio de BamHI - secuencia sentido-horquilla (5' - TTC AAG AGA - 3') - secuencia antisentido - TTTTTTTTTT - sitio Sall. En otras palabras, el molde de ADN que codifica el ARNhc específico para NP fue 5' - GGA TCT TAT TTC TTC GGA GTT CAA GAG ACT CCG AAG AAA TAA GAT CC - 3' (SEQ ID NO. 5) sin la cola poli-T y 5' - GGA TCT TAT TTC TTC GGA GTT CAA GAG ACT CCG AAG AAA TAA GAT CCT TTT TTT TTT - 3' (SEQ ID NO. 6) con la cola poli-T. Y el molde de ADN que codifica el ARNhc específico para PA fue 5' - GCA ATT GAG GAG TGC CTG ATT CAA GAG ATC AGG CAC TCC TCA ATT GC - 3' (SEQ ID NO. 7) sin la cola poli-T y 5' - GCA ATT GAG GAG TGC CTG ATT CAA GAG ATC AGG CAC TCC TCA ATT GCT TTT TTT TTT - 3' (SEQ ID NO. 8) con la cola poli-T.

[0057] Las tecnologías de ADN integradas sintetizaron las cadenas superior e inferior para la secuencia de oligonucleótidos del ADN PA. Cada oligonucleótido PA fue resuspendido a 300 µM y 120 µM de cada cadena se hibridaron juntas en una reacción de 20 µl. Después de la hibridación, el dúplex se fosforiló y se ligó en el pmbv43 lineal durante 24 horas a 4°C en una reacción de 10 µl con: 1 µl de tampón de ADN-ligasa T4 (NEB), 1 µl de oligonucleótido de PA hibridado y fosforilado, 2 µl de pmbv43, 1 µl de ADN-ligasa T4 (NEB) y 5 µl de agua molecular. La mezcla de ligamiento resultante se transformó en células competentes de DH5α™ (Life Technologies) y las células transformadas resultantes se sembraron sobre placas con caldo Luria (LB) con 10 µg/ml de canamicina (Kan) y se incubaron a 37°C durante toda la noche. Las colonias resultantes se cribaron por PCR usando cebadores específicos de PA_ARNhc que amplificaron un producto de 209 bp conforme al perfil térmico siguiente: 94°C durante 4 minutos, 30 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 45°C durante 30 segundos, 72°C durante 30 segundos y una elongación final a 72°C durante 10 minutos. Un único clon del plásmido PA_pmbv43 positivo para PCR se purificó usando el kit PureLink® HiPure Plasmid Maxiprep (Life Technologies) y se secuenció para verificar una inserción apropiada de PA_shRNA. Usando métodos estándares de clonación y purificación de plásmidos, el plásmido NP_pmbv43 fue sintetizado comercialmente, generado usando células DH10-beta y purificado por la compañía comercial DNA2.0, Incorporated. Tras recibir el NP_pmbv43, el plásmido fue resuspendido en agua molecular a una concentración final de 100 ng/µl. NP_pmbv43, PA_pmbv43 y parent_pmbv43 se transformaron en células competentes CEQ221 (vectores NP_pmbv43/CEQ, PA_pmbv43/CEQ y parent_pmbv43/CEQ) y se sembraron sobre agar infusión de cerebro y corazón con 25 µg/ml de Kan y 50 µg/ml de ácido 2,3-diaminopropiónico (BHI/Kan/Dap). Las placas fueron incubadas durante toda la noche a 37°C y se cribaron las colonias resultantes por PCR usando conjuntos de cebadores específicos para NP, PA y parent_shRNA. Se secuenció un único clon positivo para PCR que representa NP_pmbv43/CEQ, PA_pmbv43/CEQ y parent_pmbv43/CEQ. Después de la validación de las secuencias, cada clon fue propagado posteriormente en caldo BHI/Kan/Dap. Se generaron *stocks* en fase semilogarítmica ($OD_{600} = 0,4-0,6$) y en fase estacionaria ($OD_{600} = 1,0$), y se volvieron a congelar a -80°C en glicerol al 20%. Una única parte alícuota congelada de cada *stock* de vector que representa $OD_{600} = 1,0$ se descongeló para el recuento de placas. Brevemente, cada parte alícuota de 1 ml se descongeló, se centrifugó durante 5 minutos a 5.000 x g y se resuspendió en 1 ml de suero salino tamponado con fosfato (PBS) con 100 µg/ml de Dap (PBS/Dap). Los vectores resultantes fueron diluidos en PBS/Dap 1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000, 1:60.000, 1:90.000, 1:135.000, 1:270.000. Un total de 50 µl de cada dilución teórica representando 1:60.000 - 1:270.000 se sembraron por duplicado en el agar BHI/Kan/Dap y se incubaron durante toda la noche a 37°C. Los recuentos de colonias en cada dilución se promediaron y se usaron para calcular las unidades formadoras de colonias totales por ml (ufc/ml). Estos valores de recuento representaron una concentración de UFC/ml viable apropiada para los *stocks* de los vectores NP_pmbv43/CEQ (anti-AIV_NP), PA_pmbv43/CEQ (anti-AIV_PA) y parent_pmbv43/CEQ (anti-AIV_aleatorio). Este sistema permitió que las partes alícuotas se descongelen y se usen directamente en todos los futuros ensayos de invasión *in vitro*.

[0058] Además de los constructos para NP y PA, se crearon constructos para las siguientes secuencias PB1 y PB2: PB1 (5' - GAT CTG TTC CAC CAT TGA A - 3') (SEQ ID NO. 11) y PB2 (5' - CGG GAC TCT AGC ATA CTT A - 3') (SEQ ID NO. 12). La secuencia complementaria/antisentido para PB1 fue 5' - TTC AAT GGT GGA ACA GAT C - 3' (SEQ ID NO. 13) y la secuencia complementaria/antisentido para PA fue 5' - TCA GGC ACT CCT CAA TTG C - 3' (SEQ ID NO. 14). El molde de ADN que codifica el ARNhc específico para PB1 y PB2 fue: sitio de BamHI - secuencia sentido-horquilla (5' - TTC AAG AGA - 3') - secuencia antisentido - TTTTTTTTTT - sitio Sall. En otras palabras, el molde de ADN que codifica el ARNhc específico para PB1 fue 5' - GAT CTG TTC CAC CAT TGA ATT CAA GAG

ATT CAA TGG TGG AAC AGA TC - 3' (SEQ ID NO. 15) sin la cola poli-T y 5' - GAT CTG TTC CAC CAT TGA ATT CAA GAG ATT CAA TGG TGG AAC AGA TCT TTT TTT TTT - 3' (SEQ ID NO. 16) con la cola poli-T. Y el molde de ADN que codifica el ARNhc específico para PB2 fue 5' - CGG GAC TCT AGC ATA CTT ATT CAA GAG ATA AGT ATG CTA GAG TCC CG - 3' (SEQ ID NO. 17) sin la cola poli-T y 5' - CGG GAC TCT AGC ATA CTT ATT CAA GAG ATA AGT ATG CTA GAG TCC CGT TTT TTT TTT - 3' (SEQ ID NO. 18) con la cola poli-T. Se contempla además que el orden de las secuencias sentido y antisentido en el constructo podría invertirse de manera que el orden sería sitio BamHI - secuencia antisentido-horquilla (5' - TTC AAG AGA - 3') - secuencia sentido - TTTTTTTTTT - sitio Sall, aunque se prefiere colocar la secuencia sentido primero. Además, se contempla que se podrían usar secuencias de horquilla adicionales, variando en longitud de 3 a 23 nucleótidos, incluidos horquillas con 3, 4, 5, 6, 7, 9 o 23 nucleótidos. Así, las secuencias sentido y antisentido podrían estar separadas por una extensión de nucleótidos de horquilla con una longitud de 3, 4, 5, 6, 7, 9 o 23 nucleótidos (además de cualquier número de nucleótidos entre 3 y 23 nucleótidos). Se contempla además que la longitud del ARNhc/ARNip puede variar, con una variación en longitud de hasta aproximadamente 30 nucleótidos para el ARNip resultante dependiendo de la composición de la secuencia de ARNm diana. Finalmente, se contempla que podría construirse un vector para producir más de un ARNip, reconociendo así más de un ARNm de AIV o secuencias múltiples dentro de un mARNm de AIV dado usando un vector único. Sin embargo, la producción de múltiples ARNip a partir de un único plásmido puede resultar en la transcripción desigual de los ARNip.

[0059] Captación intracelular de vectores TkrNAi - Para verificar la captación bacteriana y la invasión intracelular de las células LMH, el vector anti-AIV_aleatorio fue marcado con una proteína fluorescente roja (RFP). Brevemente, el vector anti-AIV_aleatorio fue cotransformado con el vector de expresión procariótico de RFP, pE2-Crimson (Clontech), usando métodos estándares de transformación. Esta RFP fue elegida porque es una proteína fluorescente de rojo lejano con una maduración rápida, alta fotoestabilidad, citotoxicidad reducida, y se expresa del promotor lac para permitir la activación por IPTG de la expresión de RFP (Bevis y Glick 2002). Después del cultivo de los vectores anti-AIV_aleatorio_RFP (RFP-vector), se generaron y se contaron los *stocks*, tal y como se ha descrito anteriormente. Se sembraron las células LMH en portaobjetos de cámara de 8 pocillos un día antes de la invasión para permitir que las monocapas celulares alcanzaran un 60% de confluencia. El día de la invasión de vector, se descongeló una parte alícuota de 1 ml de RFP-vector, se centrifugó a 5.000 x g durante 5 minutos y se resuspendió en PBS/Dap. El vector RFP se colocó entonces en hielo y se diluyó en serie 1:4 en medio Waymouth's MB 752/1 con 2 mM de L-glutamina y 50 µg/ml de Dap partiendo con 5e7 UFC/ml y terminando con 7,8e5 UFC/ml. Para preparar las células LMH para la invasión y eliminar los antibióticos del medio de crecimiento, se aspiró el medio y cada pocillo se lavó dos veces con medio fresco Waymouth's MB 752/1 con 2 mM de L-glutamina y 50 µg/ml de Dap (medio de invasión). Se aspiró el medio de enjuague y 1 ml de RFP-vector a cada dilución se añadió a un pocillo apropiado y se dejó incubar durante 2 horas a 37°C en presencia de un 7% de CO₂. Un pocillo no tratado (medio Waymouth's MB 752/1 completo), un pocillo de control de invasión simulada (medio de invasión solo) y un pocillo de control de invasión no RFP (vector anti-AIV_aleatorio a 3,1e6 UFC/ml) se incluyeron con cada experimento de portaobjetos de cámara. Después de 2 horas de incubación, se aspiró el medio de invasión y los pocillos se lavaron dos veces con medio Waymouth's MB 752/1 completo, antes de reemplazar el medio Waymouth's MB 752/1 completo fresco y dejar que las células siguieran incubándose durante unas 2-24 horas adicionales. Para fijar las células, se aspiró el medio de crecimiento y los pocillos se enjuagaron dos veces con PBS sin calcio/magnesio. La cámara se eliminó del portaobjetos y se añadieron 10 µl de reactivo ProLong® Gold Antifade con DAPI (vital Technologies) a cada rejilla de pocillos y el portaobjetos se montó con un cubreobjetos. El portaobjetos resultante fue incubado a temperatura ambiente en ausencia de luz UV durante 24 horas antes de que se capturaran imágenes usando el microscopio fluorescente invertido Eclipse Ti (Nikon Instruments Inc.) con un aumento de 40X. Cubos de filtro para DAPI y CY5 se usaron para visualizar los fluoróforos DAPI y RFP usando una emisión de 461 y 670, respectivamente.

[0060] Concentración de vector tkRNAi óptima - Para determinar la concentración de vector óptima admisible, sin inducción concomitante de CPE, se sembraron células LMH en placas de 24 pocillos un día antes de la invasión para permitir que las monocapas celulares alcancen un 80% de confluencia. Se preparó el vector anti-AIV_aleatorio, tal y como se ha descrito anteriormente, y se diluyó en medio de invasión a 5e7, 1,25e7, 3,1e6 y 7,8e5 UFC/ml. Las células LMH se prepararon para la invasión, como se ha descrito anteriormente. El medio de enjuague se aspiró y 1 ml de vector anti-AIV_aleatorio a cada dilución se añadió a un pocillo apropiado, por triplicado, y se dejó incubar durante 2 horas a 37°C en presencia de un 7% de CO₂. Cada placa incluía un pocillo no tratado (medio Waymouth's MB 752/1 completo) y un pocillo de invasión simulada (solo medio de invasión). Después de 2 horas de incubación, se aspiró el medio de invasión y los pocillos se lavaron dos veces con medio Waymouth's MB 752/1 completo antes de reemplazar el medio Waymouth's MB 752/1 completo fresco y se dejó que las células siguieran incubándose durante unas 24-48 horas adicionales. En múltiples puntos temporales posteriores a la invasión, se observaron los pocillos en busca de señales visuales de CPE, en comparación con los pocillos de control no tratados. Se seleccionó la máxima concentración de vector anti-AIV_aleatorio admisible, sin inducir un CPE, para todos los ensayos de invasión anti-AIV_NP y anti-AIV_PA posteriores en células LMH.

[0061] Invasión de células de pollo con vectores de ARNhc tkRNAi - Se sembraron células LMH en placas de 24 pocillos un día antes de la invasión para permitir que las monocapas celulares alcanzasen un 80% de confluencia. El día de la invasión de vector, se descongeló una parte alícuota de 1 ml de vector anti-AIV_NP, anti-AIV_PA y anti-

AIV_aleatorio, se centrifugó a 5.000 x g durante 5 minutos y se resuspendió en PBS/Dap. Cada vector se colocó entonces en hielo y se diluyó apropiadamente para el ensayo de invasión. Las células LMH fueron preparadas para la invasión, tal y como se ha descrito anteriormente. Los pocillos fueron evaluados por triplicado e incluían vector anti-AIV_NP, anti-AIV_PA, anti-AIV_aleatorio y un cóctel de anti-AIV_NP + anti-AIV_PA (anti-AIV_cóctel). Así, el "cóctel" era una mezcla 1:1 de la *E. coli* que llevaba el vector anti-AIV_NP y la *E. coli* que llevaba el vector anti-AIV_PA. Los pocillos de control también se incluyeron por triplicado (invasión simulada y no tratados). Después de 2 horas de incubación, las células LMH se lavaron (descrito previamente) y se reemplazó el medio Waymouth's MB 752/1 completo fresco.

[0062] Infección de virus - Veinticuatro horas después de la invasión las células LMH fueron preparadas para la infección eliminando el medio de crecimiento y lavando cada pocillo con IM con 0,25 µg/ml de TPCK, tal y como se ha descrito anteriormente. Se eliminó el lavado y se añadieron un total de 250 µl de IM con virus o H8N4 o H6N2 con una MOI de 0,01 o 0,001 a cada pocillo apropiado. Las placas fueron incubadas en una plataforma basculante a 37°C en presencia de un 7% de CO₂ durante 1 hora antes de eliminar el virus y reemplazarlo con 750 µl/pocillo de IM fresco. A las cuarenta y ocho hpi se cosecharon los sobrenadantes de los cultivos celulares, se centrifugaron y se congelaron a -80°C. Cada experimento incluía un control positivo (solo infectados con AIV), un control negativo (no tratados) y un control de invasión simulada (invasión simulada + infectados con AIV) cada uno evaluado en pocillos por triplicado.

[0063] Evaluación del título de virus infeccioso - Los sobrenadantes de los cultivos celulares de LMH fueron cuantificados por titulación de punto final en células MDCK tal y como se ha descrito anteriormente usando cálculos TCID₅₀/ml. Brevemente, los sobrenadantes cosechados se descongelaron, se diluyeron con un factor de diez, y se cubrieron con 100 µl/pocillo de suspensión de virus por triplicado en placas de 96 pocillos sembradas con MDCK. Las células se tiñeron con violeta cristal 48 hpi y los pocillos con CPE fueron marcados como positivos para el crecimiento de virus. La TCID₅₀/ml se calculó mediante la técnica matemática de Reed y Muench (Reed y Muench 1938).

[0064] Análisis estadístico - Todos los experimentos se repitieron un mínimo de tres veces, en días diferentes. Usando un nivel de significación estadística de 0,05, se realizó la prueba de la suma de rangos de Wilcoxon para comparar los títulos virales medios entre las muestras tratadas con vector y de control positivo no tratadas (PC) realizadas el mismo día. Para determinar si los valores de LogTCID₅₀/ml medios ajustados entre las muestras tratadas con vector y las PC fueron estadísticamente diferentes ($p < 0,05$), los datos se analizaron usando la regresión lineal multivariante, controlando el día. Los análisis estadísticos se realizaron usando el *software* informático Stata 10 (Statcorp LP).

RESULTADOS

[0065] Verificación de la captación intracelular de vectores TkrNAi en células de pollo - La captación de los vectores TkrNAi por las células epiteliales funciona por endocitosis mediada por receptores cuando la proteína de superficie bacteriana, invasina, interactúa con el receptor huésped, $\beta(1)$ integrina. Era por lo tanto importante verificar la presencia y la expresión estable de la $\beta(1)$ integrina en células LMH de pollo durante condiciones normales de crecimiento y durante la infección con AIV. Después de la extracción de ARN y la síntesis de ADNc, se observó la expresión de la $\beta(1)$ integrina en células LMH cultivadas usando condiciones de crecimiento normales, al igual que en células infectadas con virus H8N4 (MOI 0,01) a las 6 y las 24 horas posteriores a la infección (FIG. 2). Estos resultados indicaron que el vector tkrNAi debería unirse apropiadamente a las células LMH, incluso cuando las células muestran signos de CPE y enfermedad tras la infección. El marcado del vector anti-AIV_aleatorio con una RFP verificó la expresión intracelular dentro de las células LMH a las 2 y las 24 horas posteriores a la invasión (FIG. 3). La concentración de RFP-vector máxima admisible, sin inducir un CPE, fue de 7,8e5 UFC/ml. Por lo tanto, todos los experimentos posteriores adoptaron esta concentración de vector. Juntos, estos resultados indican que la plataforma de transferencia de tkrNAi es apropiada para células epiteliales de pollo.

[0066] Actividad antivírica de vectores de ARNhc tkrNAi en células de pollo - Se mostró previamente que las secuencias de ARNip de NP y PA se alinean contra las secuencias de NP y PA de H8N4 y H6N2 con un 100% de homología y están desprovistas de cualquier emparejamiento inespecífico con cualquier secuencia de pollo conocida. Antes de la infección con virus H6N2 o H8N4, las células LMH se trataron primero con vector y tras la infección se recogieron los sobrenadantes de cultivo para el análisis de la TCID₅₀.

[0067] Como se esperaba, la actividad antivírica de cada vector varía por día, pero también por virus y MOI usada para la infección (FIG. 4). Sin embargo, se observa una actividad antivírica significativa en muestras de anti-AIV_NP, anti-AIV_PA y anti-AIV_cóctel de infecciones tanto de H6N2 como de H8N4. En al menos un día de prueba experimental, anti-AIV_NP, anti-AIV_PA y el anti-AIV_cóctel redujeron significativamente los títulos medios de virus en ambos virus con una MOI de 0,01, en comparación con las muestras PC correspondientes. Los vectores parecían tener un efecto antivírico ligeramente menos profundo a una MOI viral de 0,001. A pesar de una falta de

diferencias significativas posiblemente asociadas a un tamaño de muestra pequeño, el 100%, el 89% y el 100% de todos los tratamientos con vectores NP, PA y anti-AIV_cóctel resultaron en títulos virales medios inferiores en comparación con sus PC no tratados apropiados, respectivamente. Debe observarse que el vector anti-AIV_aleatorio resultó también en títulos virales medios inferiores, alguno de los cuales fueron significativamente diferentes de las muestras PC (FIG. 4).

5

[0068] Controlando el día, el análisis de regresión lineal multivariante (MLR) se usó para comparar células LMH tratadas con vector con células PC no tratadas a lo largo de todos los días experimentales. Diferencias significativas en títulos virales medios ajustados entre muestras tratadas con vector y PC no tratadas se muestran en la tabla 2. El análisis de MLR indica diferencias significativas entre todos los tratamientos con vector (excluyendo el anti-AIV_aleatorio) y sus muestras PC correspondientes después de la infección tanto con H6N2 como con H8N4 con una MOI de 0,01. Con la excepción de la infección con H8N4 MOI 0,001, en todos los conjuntos experimentales el vector de cóctel resultó en títulos virales significativamente inferiores en comparación con los títulos PC apropiados ($p < 0,05$). Se calculó la reducción log₁₀ en el virus infeccioso entre las muestras tratadas con vector y las no tratadas. Todas las muestras tratadas con vector resultaron en al menos una reducción log₁₀ de 0,8 (factor de reducción de 6). Más notable fue la infección con H8N4 con una MOI de 0,01 después del tratamiento con el vector NP (reducción log 3,8 o factor de reducción de 6.918), PA (reducción log 2,5 o factor de reducción de 331) y anti-AIV_cóctel (reducción log 4 o factor de reducción de 10.965) así como con H8N4 con una MOI de 0,001 después del tratamiento con el vector anti-AIV_PA (reducción log 3,0 o factor de reducción de 1.000). De manera interesante, el vector aleatorio mostró también actividad antivírica en todos los conjuntos experimentales, salvo infección con H6N2 con una de MOI 0,001 (tabla 2).

10
15
20

Tabla 2 - Protección del vector anti-AIV en células LMH de pollo según se mide por la reducción log y el factor de reducción en títulos de diseminación.

Muestra	n	Media ajustada ^a	95% CI	Media ajustada (no tratada)	95% CI (no tratada)	valor P ^b	reducción log ^c	factor de reducción ^d
<u>Virus de LPAI H8N4 MOI 0,01</u>								
anti-AIV_NP	9	1,1	(0,0; 2,6)	4,9	(3,7; 6,2)	<0,001	3,8	6918
anti-AIV_PA	9	3,0	(2,1; 3,8)	5,5	(4,6; 6,4)	< 0,001	2,5	331
anti-AIV_cóctel	9	0,9	(0,0; 2,1)	4,9	(3,9; 6,0)	< 0,001	4,0	10,965
anti-AIV_aleatorio	10	2,8	(2,0; 3,5)	4,9	(4,1; 5,8)	< 0,001	2,1	138
<u>Virus de LPAI H8N4 MOI 0,001</u>								
anti-AIV_NP	9	8,1	(6,3; 9,8)	8,9	(7,9; 10,0)	0,309	0,8	6
anti-AIV_PA	9	5,8	(4,9; 6,8)	8,8	(8,0; 9,5)	< 0,001	3,0	1,000
anti-AIV_cóctel	9	7,9	(6,3; 9,5)	8,9	(7,9; 9,9)	0,213	1,0	10
anti-AIV_aleatorio	10	7,3	(6,0; 8,6)	8,5	(7,5; 9,5)	0,064	1,2	16
<u>Virus de LPAI H6N2 MOI 0,01</u>								
anti-AIV_NP	9	4,7	(3,1; 6,2)	6,3	(4,8; 8,0)	0,043	1,6	43
anti-AIV_PA	9	4,9	(3,6; 6,2)	6,3	(4,8; 7,9)	0,031	1,4	27
anti-AIV_cóctel	9	4,4	(3,0; 5,9)	6,3	(4,9; 7,8)	0,013	1,9	85
anti-AIV_aleatorio	9	5,5	(4,6; 6,3)	6,3	(5,3; 7,4)	0,053	0,8	7
<u>Virus de LPAI H6N2 MOI 0,001</u>								
anti-AIV_NP	9	9,2	(7,5; 9,3)	10,1	(9,1; 11,1)	0,270	0,9	8
anti-AIV_PA	9	9,5	(8,1; 10,9)	10,5	(9,4; 11,7)	0,149	1,0	10
anti-AIV_cóctel	9	8,4	(7,1; 9,8)	10,1	(9,2; 10,9)	0,023	1,7	50
anti-AIV_aleatorio	9	11,3	(9,8; 12,8)	10,5	(9,3; 11,6)	0,269	-0,8	0

Los resultados son de regresión lineal multivariante, controlando el día. ^a Expresado como LogTCID₅₀/mL medio ajustado. ^b Comparación del LogTCID₅₀/mL medio ajustado de muestras PC tratadas con muestras no tratadas (p<0,05). ^c Reducción log en el título infeccioso medio en comparación con el control no tratado. ^d Factor de reducción en la media geométrica en comparación con el control no tratado.

5 [0069] El objetivo de este ejemplo y la aplicación de sus instrucciones es proporcionar un medio no necesariamente
para evitar la infección, sino para reducir la cantidad de virus infeccioso diseminado en los sobrenadantes de los
cultivos después de tratar las células LMH con los vectores anti-AIV. El tratamiento *in vitro* con estos vectores
antivíricos redujo significativamente los títulos infecciosos tras la infección con dos subtipos diferentes de AIV
10 aislados en aves de corral; H8N4 y H6N2. En todos menos en un conjunto de muestras (H8N4/MOI 0,001), el vector
de cóctel redujo significativamente los títulos virales. Sin embargo, incluso cuando no se observó una diferencia
significativa entre muestras tratadas con vector y PC no tratadas, se observó una reducción log₁₀ notable en el
título infeccioso de todos los conjuntos de muestras tratadas con vector. La inhibición más potente de diseminación
de virus infeccioso ocurrió después de que las células LMH fueran tratadas con anti-AIV_cóctel e infectadas con
15 H8N4 o H6N2, resultando en reducciones log₁₀ significativas que varían de 1,7 a 4,0 (factor de reducción de 50 a
10.965).

[0070] Como se indicó antes, el tratamiento con el vector aleatorio redujo también los títulos infecciosos en todos
menos en el conjunto de muestras infectadas con H6N2/MOI 0,001. Hay una posible explicación para esta
observación. La respuesta inmunitaria innata es parte del mecanismo de defensa temprana del huésped. Los
20 receptores de tipo Toll (TLR) juegan un papel clave en la respuesta innata reconociendo y uniéndose a
componentes bacterianos, que son los marcadores de infección de células huésped. Estos componentes
bacterianos, denominados también patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), incluyen endotoxinas,
como el lipopolisacárido, que hacen de potenciadores inmunitarios (Bessler et al 1990). Estos vectores anti-AIV son
transferidos por bacterias *E. coli* no patógenas, por lo tanto, no es sorprendente que estas células epiteliales de
25 pollo detectarían la presencia extracelular de estas endotoxinas bacterianas, posiblemente a través del
reconocimiento del TLR-4 (Schoen et al 2004). Este evento de unión llevaría a la expresión del factor de
transcripción inflamatorio, factor nuclear kappa β , y en última instancia la liberación de citocinas y quimiocinas
proinflamatorias aguas abajo como parte de la respuesta innata. En este caso, estos componentes bacterianos
podrían estar actuando de manera muy similar a un adyuvante vacunal, estimulando así la respuesta innata antes
de la infección de AIV y esencialmente montando un nivel adicional de protección contra la infección viral.

30 [0071] Este ejemplo demuestra una prueba de concepto *in vitro* y muestra el potencial antivírico de estos novedosos
vectores anti-AIV en un modelo de tejido aviar. Sin embargo, ¿sugieren estos datos que un cóctel de vectores anti-
AIV que reconozca NP y PA podría reducir significativamente la diseminación de AIV en pollos? ¿Podría este
enfoque traducirse en una tecnología antivírica que limite los brotes de AIV y la transmisión en aves de corral? Aún
35 más, ¿podría esto representar un enfoque transformador para controlar la gripe en otras especies? Este trabajo
representa los primeros pasos para responder estas preguntas. Un objetivo de esta investigación es desarrollar el
profiláctico descrito en un complemento novedoso a la vacuna del AIV tradicional para aves de corral. Como tal, los
hallazgos de este trabajo han sido traducidos en esfuerzos dirigidos a la evaluación de la eficacia de estos vectores
antivíricos en pollos experimentalmente inoculados como se ha descrito en el ejemplo 3, inmediatamente a
40 continuación. El objetivo a largo plazo es desarrollar un profiláctico antigripal innovador que contribuya al desarrollo
de un método de control más eficaz y robusto del AIV en aves de corral.

Ejemplo 3 - Tratamiento profiláctico de poblaciones de pollos con vectores anti-AIV

[0072] Ante un brote de AIV, varios factores son críticos para controlar eficazmente la propagación del virus entre
las aves de corral. Estos incluyen la velocidad a la cual se aplica un método de control o vacuna, cómo de rápido
45 funciona un profiláctico para proteger y la capacidad para proteger contra cualquier subtipo o cepa de AIV. El
desarrollo de una tecnología antigripal potente para aves de corral es un paso crítico para gestionar y controlar
eficazmente la propagación de esta enfermedad a nivel mundial. El trabajo precedente demostró el valor de usar
vectores anti-AIV novedosos que reconocen los genes NP y PA virales para reducir los títulos de diseminación viral
in vitro, pero aún tienen que evaluarse *in vivo* usando pollos experimentalmente inoculados. La captación de vector
50 en los tejidos respiratorios de los pollos se evaluó primero usando unos vectores marcados con proteína roja
fluorescente para la visualización. Una vez se demostró la captación del vector y una falta de patogenicidad
asociada al vector en pollos, grupos de pollos comerciales fueron tratados con los vectores de cóctel (n=10), un
vector aleatorio (n=10) o un placebo (n=10). Veinticuatro horas más tarde, todos los pollos fueron inoculados con
virus H6N2. Los pollos tratados profilácticamente con los vectores de cóctel anti-AIV diseminan significativamente
menos virus en comparación con los pollos no tratados (p<0,05). Asimismo, la proporción de pollos que diseminan
55 virus fue significativamente menor en los pollos tratados con cóctel anti-AIV en comparación con los pollos no
tratados (p<0,05). Los cócteles anti-AIV también evitaron la transmisión a pollos centinela. Este trabajo demuestra
una prueba de concepto *in vivo* para usar esta tecnología antivírica de ARNi novedosa para proteger pollos contra
la replicación del AIV, la diseminación viral y la transmisión.

MATERIALES Y MÉTODOS

[0073] Animales - Pollos Leghorn comerciales de cuatro semanas de edad fueron donados gentilmente por una granja de producción comercial en Colorado y alojados en una instalación de nivel de bioseguridad 2. Tras la llegada, las aves fueron asignadas de forma aleatoria a un grupo de tratamiento seleccionando a ciegas bandas de patas codificadas por colores colocadas en una caja. El día de la llegada, se recogió sangre de la vena braquial y se tomó un frotis orofaríngeo (OP) para verificar el estado libre de AIV usando un análisis serológico y una RT-PCR en tiempo real. Grupos de aves fueron alojados en una cámara que contiene habitaciones separadas de 12 pies cuadrados, conforme a la guía para el cuidado y el uso de animales de laboratorio. Se mantuvo un flujo de aire negativo para evitar la contaminación cruzada entre habitaciones, por lo cual el aire era positivo para el pasillo central de la cámara durante todo el curso del estudio. Se permitió que los grupos de pollos deambularan libremente dentro de cada habitación y se les proporcionó acceso *ad libitum* a pienso y agua. Se mantuvo la temperatura ambiente a 70°F y se controlaron las luces a diario para permitir un tiempo adecuado para la actividad diurna y el descanso. El cuidado animal para cada experimento se realizó bajo la aprobación del comité IACUC de la Universidad del Estado de Colorado. Para dar tiempo a los pollos a aclimatarse a su nuevo entorno, todos los estudios experimentales comenzaron al menos 4 días después de su llegada.

[0074] Virus - El LPAI A/Chicken/Texas/473-2/10 (H6N2) fue gentilmente proporcionado por el laboratorio de servicios veterinarios nacional de Estados Unidos (NVSL) en Ames, IA. El virus H6N2 fue elegido debido a su historia de ser aislado de frotis respiratorios de pollo recogidos durante un brote en 2010 ocurrido en Texas. El virus fue propagado y valorado en la cavidad alantoidea de óvulos de pollo de 10 días libres de patógeno específico (SPF) embrionados durante 2 días a 37°C. Brevemente, después de cultivar el virus, el fluido amnioalantoideo (AAF) fue cosechado y agrupado para representar un stock de virus único. Para valorar el virus, una parte alícuota del stock fue diluida con un factor de diez de 1:10 a 1:10¹⁰ en caldo de infusión cerebro-corazón (BHI) con cóctel de antibióticos 1X (2000 U/ml de penicilina G, 4 mg/ml de estreptomycin, 16 µg/ml de gentamicina, 100 U/ml de niastatina, 650 µg/ml de canamicina) y se usó 0,1 ml para inocular 3 óvulos SPF a cada dilución. El AAF fue cosechado y se calculó el 50% del título infeccioso de los huevos (EID₅₀/ml) según la fórmula matemática de Reed y Muench.

[0075] Administración del vector - Los *stocks* de vector se generaron y se volvieron a congelar a concentraciones UFC/ml apropiadas (como se ha descrito previamente) de modo que no fueron necesarios cultivos y recuentos adicionales. Esto permitió esencialmente que las partes alícuotas de vector fueran usadas directamente como la dosis de tratamiento apropiada para la administración directa a un ave. Brevemente, se descongeló un volumen apropiado de *stock* de vector, se centrifugó a 5.000 x g durante 5 minutos y se resuspendió en PBS con 50 µg/ml de ácido 2,3-diaminopropiónico (Dap). El vector de cóctel representó una concentración igual (UFC/ml) en un volumen igual (basado en el volumen de la dosis total) de los vectores NP (NP_pmbv43/CEQ) y PA (PA_pmbv43/CEQ). Los vectores fueron transportados en hielo a la instalación de alojamiento de los pollos. El vector fue administrado por la vía intranasal (0,3 - 0,5 ml por ave). Cada pollo fue suavemente contenido durante la dosificación y se administró un volumen igual en cada fosa nasal. Se contuvo al ave durante un minuto adicional para prohibir que estornudase y permitir que el vector se depositara en los tejidos nasales para una invasión eficiente.

[0076] Exposición al virus - Para emular la vía natural de infección para el AIV en un marco experimental, los pollos fueron inoculados a las 5 semanas (± 4 días) de edad con 10⁶ EID₅₀/0,1 ml de solución de virus H6N2. Antes de la inoculación, el virus fue diluido en PBS estéril a la dosis deseada y almacenado en frío hasta que estuvo preparado para la exposición. Durante la exposición, cada animal fue suavemente contenido mientras personal preparado inoculaba 50 µl de virus en cada fosa nasal. Después de la exposición, cada ave fue contenida durante 1 minuto adicional para prohibir que estornudase y permitir que el virus se depositara en los tejidos nasales para una infección eficiente. Los pollos fueron evaluados a diario para detectar una enfermedad clínica.

[0077] Colección de datos y muestras - Tras la inoculación viral y/o de vector, los pollos fueron inspeccionados a diario usando el sistema de puntuación de enfermedad clínica (0-4): 1 = evidencia de letargo moderado por falta de interés en el pienso, movimiento lento y reacción baja al entorno externo; 2 = enfermedad respiratoria moderada (respiración con la boca abierta, ronquido, estornudos), acompañada por letargo moderado; 3 = enfermedad respiratoria moderada (ronquido, estornudos, tos moderada, respiración áspera), acompañada por letargo moderado; y 4 = enfermedad respiratoria grave (tos, estornudos, respiración dificultosa), acompañada por falta de alimentación con movimiento o reacción al entorno externo limitados. Después de la exposición al virus H6N2, se recogieron frotis OP de aves infectadas a los 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 10 días posteriores a la infección (dpi). Los frotis se sumergieron inmediatamente y se enjuagaron en un tubo Falcon con 1 ml de medio de almacenamiento de caldo de infusión cerebro-corazón (BHI) y se colocaron en hielo. El personal que recogía los frotis se cambiaba los guantes y los botines entre grupos para evitar una potencial contaminación cruzada. Las muestras se almacenaron a -70°C hasta la posterior PCR a tiempo real cuantitativa de transcriptasa inversa (RT-qPCR). En tiempos apropiados, las aves fueron sometidas a eutanasia por CO₂ y se recogieron los tejidos en necropsia para valorar la captación de RFP-vector, la patogénesis asociada al vector o la infección viral.

[0078] Detección de diseminación viral por RT-qPCR - Todas las muestras de frotis OP recogidas sobre el periodo de infección se procesaron para una RT-qPCR para determinar los títulos virales de H6N2. Brevemente, se extrajo ARN total de 50 µl de muestra de frotis OP usando Trizol LS (Life Technologies, Grand Island, NY) y el kit MagMAX 96 AI/ND Viral RNA isolation (Life Technologies) con el procesador de partículas magnéticas KingFisher (Thermo Scientific, Waltham, MA). La RT-qPCR fue realizada usando la plataforma ABI 7500 (Applied Biosystems) y con cebadores y sonda específicos para secuencias conservadas en el gen de la matriz de la gripe aviar tal y como se ha descrito anteriormente (Spackman et al 2002) y conforme al protocolo del NVSL AVSOP1521.01. Las secuencias de los cebadores y la sonda fueron las siguientes: cebador directo (5'-AGA TGA GTC TTC TAA CCG AGG TCG-3'), cebador inverso (5'-TGC AAA AAC ATC TTC AAG TCT CTG-3') y sonda marcada con tinte indicador 5' (5'- 6-carboxifluoresceína [FAM]) (5'- FAM-TCA GGC CCC CTC AAA GCC GA-TAMRA-3') tinte indicador 3' (6-carboxitetrametilrodamina [TAMRA]). Las condiciones del paso de RT fueron 30 min a 50°C y 15 min a 94°C, seguido de 45 ciclos de 94°C durante 0 s y 60°C durante 20 s. La curva estándar para la cuantificación del virus fue generada por triplicado usando una serie de diluciones de factor 10 de 1:10 a 1:10¹⁰ del virus de *stock* H6N2 del que se pudieron calcular equivalentes de EID₅₀ por ml (EID₅₀ eq/ml) de medio de muestra de cada muestra de ARN. Se determinó que el límite de detección era de 10¹ EID₅₀/ml (1 log₁₀ EID₅₀/ml) por reacción.

[0079] Serología - Tras la llegada a la instalación de alojamiento, se evaluó el suero recogido de todas las aves por la prueba de inmunodifusión en gel de agar (AGID) y se mostró que era negativa para anticuerpos para cualquier antígeno viral de la gripe de tipo A. Los pollos infectados fueron desangrados el día 10 posterior a la infección y los sueros fueron evaluados de nuevo usando la prueba AGID.

[0080] Análisis estadístico - La estadística descriptiva incluyó los títulos virales medios con intervalos de confianza (CI) al 95%, picos y rangos de los títulos, proporciones de pollos con diseminación y factores de reducción en los títulos de diseminación. Se analizaron las diferencias en la proporción de pollos con diseminación de virus usando la prueba exacta de Fisher ($p < 0,05$). Se analizaron las diferencias en los títulos virales medios entre pollos tratados y no tratados usando la prueba de la suma de rangos de Wilcoxon ($p < 0,05$). Se usó la regresión lineal multivariante (MLR), controlando el día, para determinar si los valores Log EID₅₀ eq/ml medios ajustados de las muestras OP recogidas de pollos tratados con vector y PC no tratados fueron estadísticamente diferentes ($p < 0,05$). Se usó el análisis de regresión logística para determinar la razón de probabilidades (OR) de diseminación en pollos tratados en comparación con pollos PC no tratados ($p < 0,05$), por día individual al igual que a lo largo de todos los días. Se realizaron análisis estadísticos usando el *software* informático estadístico Stata 10 (Statcorp LP).

[0081] Diseño experimental - Este trabajo incluyó tres estudios piloto iniciales, donde cada uno requería el examen comparativo de las aves, para verificar la captación de vector anti-AIV en los tejidos respiratorios de pollo, determinar la dosis de vector anti-AIV apropiada y verificar que el virus H6N2 es apropiado para inocular a los pollos. Los hallazgos de estos experimentos de exploración piloto fueron una parte esencial de planificación de la cuarta parte del trabajo *in vivo* descrito, el estudio de prueba de concepto (POC) final. Los hallazgos de los estudios piloto iniciales no se usaron para extrapolar a poblaciones de pollos debido al tamaño de muestra limitado y la falta de potencia.

Piloto 1: dos grupos de dos pollos se alojaron en habitaciones separadas y se les administró el RFP-vector (parent_pmbv43/CEQ_RFP, previamente descrito) a 1,6e8 ufc en una dosis única de 500 µl. Se sometió a eutanasia a cada grupo de dos pollos por inhalación de CO₂ a las 15 y las 27 horas posteriores al tratamiento con RFP-vector. Los tejidos respiratorios se recogieron en necropsia, incluidos seno, tráquea, faringe y pulmones, y el proventrículo de cada animal se recogió de forma similar. En tres horas, estos tejidos se prepararon para la microscopía fluorescente y la observación posterior de la expresión de RFP que indica la adherencia y la captación intracelular del vector. Brevemente, los tejidos se congelaron criogénicamente y se seccionaron usando una máquina criostática. Se montaron secciones de tejido en cubreobjetos de vidrio usando el reactivo ProLong® Gold Antifade con DAPI y se cubrieron con un cubreobjetos. Después de 24 horas de incubación a temperatura ambiente, los portaobjetos se mantuvieron a 4°C hasta que se capturaron imágenes usando el microscopio fluorescente invertido Eclipse Ti usando una emisión de 461 y 670. El objetivo de este estudio piloto fue el de verificar que estas bacterias *E. coli* son vehículos apropiados para reconocer específicamente y transferir los vectores anti-AIV a los tejidos respiratorios de pollo. El cálculo estadístico y la justificación de potencia no fue aplicable para determinar el número de pollos necesarios para conseguir el objetivo asociado al piloto 1. Estas fueron observaciones cualitativas, no dirigidas a detectar una diferencia en los efectos medidos entre los dos grupos sino más bien interesadas en determinar si estos vectores son vehículos de transferencia óptimos para los tejidos respiratorios de pollo. Un tamaño de muestra de dos pollos por grupo fue adecuado para proporcionar múltiples muestras de tejido para los análisis propuestos.

Piloto 2: dos grupos de cinco pollos fueron alojados en habitaciones separadas y se les administró el vector aleatorio (parent_pmbv43/CEQ, previamente descrito) con una de dos dosis; 1,36e7 o 3,6e8 ufc por dosis de 500 µl. El piloto 2 requirió un grupo de cinco pollos para servir como el grupo de control no tratado. A estos pollos se les administraron 500 µl de PBS/Dap y sirvieron como la línea base para comparar con puntuaciones de enfermedad clínica e histología. Los pollos fueron monitoreados a diario para detectar una enfermedad

clínica y los pollos tratados con vector sometidos a eutanasia el día 3 (n=2), día 7 (n=2) y el día 14 (n=1). Las aves de control no tratadas fueron sometidas a eutanasia el día 3 (n=1), día 7 (n=2) y el día 14 (n=2). Durante la necropsia, los pollos fueron evaluados para señales macroscópicas de patogénesis y/o inflamación indicativa de infección bacteriana y se recogieron los tejidos de seno, tráquea, faringe, pulmones y proventrículo. El tejido se fijó en solución de formalina tamponada neutra al 10%, seccionado y teñido con hematoxilina y eosina. El objetivo de este estudio piloto fue el de verificar que estos vectores son bien tolerados en las dos dosis administradas, sin una inducción concomitante de señales macroscópicas o microscópicas de daño epitelial el día 3, 7 y 14 posterior al tratamiento, en comparación con los tejidos no tratados. El cálculo estadístico y la justificación de potencia no fue aplicable para determinar el número de pollos necesarios para conseguir el objetivo asociado al piloto 2. Estas fueron observaciones cualitativas, dirigidas a determinar la máxima dosis de vector tolerable, basándose en la enfermedad clínica media más baja y señales macroscópicas o microscópicas observables de daño epitelial mínimas. Un tamaño de muestra de cinco pollos por grupo fue adecuado para calcular las puntuaciones de enfermedad clínica medias en cada grupo. El piloto 2 fue necesario para determinar la dosis de vector anti-AIV óptima para el experimento POC final.

Piloto 3: un grupo de diez pollos fue inoculado con el virus de LPAI H6N2. Los pollos fueron evaluados a diario para detectar una enfermedad clínica y los frotis OP recogidos para detectar la diseminación viral usando una RT-qPCR. A los 10 dpi los pollos fueron sometidos a eutanasia. El propósito del piloto 3 fue el de verificar la susceptibilidad de los pollos a una infección tras la exposición a H6N2 mediante puntuaciones de enfermedad clínica y/o la detección con RT-qPCR.

[0082] **Prueba de concepto (POC):** a tres grupos de diez pollos, alojados en tres habitaciones separadas, se les administró $3,6 \times 10^8$ ufc de vector o un placebo en una dosis de 300 μ l. Estos grupos incluían el grupo 1 = vector de cóctel anti-AIV, grupo 2 = vector aleatorio y grupo 3 = control positivo (solución PBS/Dap). Todas las aves fueron inoculadas por vía intranasal (IN) con virus H6N2 a las 20 horas posteriores al tratamiento (\pm 2 horas). Los pollos fueron evaluados a diario para detectar una enfermedad clínica y se recogieron frotis OP. A los 10 dpi los pollos fueron sometidos a eutanasia y sometidos a necropsia para detectar señales de enfermedad y la colección de seno, tráquea, faringe, pulmones, hígado y bazo. Una mitad de la sección de tejido fue fijada en solución de formalina tamponada neutra al 10%, mientras que la mitad restante de tejido fresco fue almacenado a -80°C . Este trabajo requirió tres grupos de animales (n=10 para cada grupo) para determinar estadísticamente diferencias en la diseminación viral entre pollos tratados con los vectores anti-AIV y pollos de control positivo no tratados. Se calcularon tamaños de muestra estimados para conseguir al menos un 80% de potencia con un nivel de significación del 95% usando los análisis estadísticos previamente indicados (prueba de suma de rangos de Wilcoxon, prueba exacta de Fisher, regresión lineal multivariante y regresión logística). La medición más crítica es la $\text{EID}_{50}/\text{ml}$, ya que este valor representa un título viral, que indica diseminación viral. Por lo tanto, el cálculo de potencia se basó en las mediciones esperadas de $\text{EID}_{50}/\text{ml}$. Se estimó que el título viral medio en los pollos no tratados sería 5,5 log $\text{EID}_{50}/\text{ml}$ con desviación típica (SD) $\pm 0,5$ log $\text{EID}_{50}/\text{ml}$ (Swayne y Beck, 2005). Para este trabajo, al menos un factor de reducción de 5 (diferencia de 0,7 log $\text{EID}_{50}/\text{ml}$) en títulos virales se consideraría estadísticamente significativo. Por lo tanto, el título viral medio estimado para los pollos tratados sería 4,8 log $\text{EID}_{50}/\text{ml}$ con SD $\pm 0,5$ log $\text{EID}_{50}/\text{ml}$. El tamaño de efecto calculado fue 1,4 ((media más grande - media más pequeña)/SD = (5,5-4,8)/0,5). Usando el código Stata, fpower, la tabla de resultados indicó que se requería un tamaño de muestra de entre 9 y 10 para conseguir una potencia de 0,8 con $\alpha = 0,05$. Un tamaño de muestra de diez fue suficiente para demostrar un factor de reducción ≥ 5 en la diseminación viral asociada a pollos tratados con el vector de cóctel que expresa ARNhc específicos virales en comparación con pollos PC no tratados o pollos tratados con vector aleatorio.

[0083] **Centinelas:** dos pollos comerciales de 4 semanas de edad adicionales fueron añadidos al envío de treinta animales para el estudio POC final. En lugar de realizar una eutanasia a estos animales extra, fueron alojados entre los diez pollos inoculados con H6N2 que habían recibido adicionalmente el vector de cóctel anti-AIV. Estos centinelas estaban en contacto directo con estos animales infectados y compartieron el mismo alimento y agua. El objetivo de usar estos dos pollos centinela fue el de controlar una posible transmisión.

RESULTADOS

[0084] **Localización de RFP-vector en tejidos respiratorios de pollo** - En el piloto 1, los animales fueron sometidos a eutanasia y se recogieron tejidos 15 y 27 horas después de que los pollos fueran tratados con el RFP-vector. Estos tejidos fueron preparados para microscopía fluorescente y se capturaron imágenes de tejidos tratados y no tratados. Esta RFP es generada por el vector de expresión procariótico, pE2-Crimson (Clontech). Esta proteína fluorescente es muy brillante, fotoestable y no citotóxica debido a su solubilidad en el citosol de las células huésped (Strack et al 2011). También se eligió debido a sus propiedades de emisión y excitación en el rojo lejano, lo que permite la diferenciación entre esta señal fluorescente roja y un posible fondo debido a la autofluorescencia. Mostrado en la figura 5, las bacterias que expresan RFP parecen localizarse en el epitelio de los tejidos de seno, tráquea y pulmones en ambos puntos temporales. Esto contrasta con una falta de expresión de rojo visible en aquellos tejidos recogidos de pollos tratados con PBS/Dap.

[0085] Dosis de vector óptima y patogenicidad asociada - En el piloto 2, a los pollos se les administró una de dos dosis de vector aleatorio y fueron observados durante 14 días. Entre los días 1-14 posteriores al tratamiento, las aves en todos los grupos no mostraron señales de ninguna aflicción o enfermedad clínica. Con ambas dosis de vector, los grupos de pollos fueron sometidos a eutanasia el día 3 (n=2), 7 (n=2) y 14 (n=1) posterior al tratamiento y en necropsia todos los tejidos parecían normales en comparación con los tejidos de las aves tratadas con el placebo (PBS/Dap). No se observó ninguna patogénesis obvia en los tejidos de proventrículo. La evaluación histológica indicó que el tratamiento con vector no estaba asociado a una patogénesis del tejido respiratorio cuando se compara con los tejidos tratados con PBS/Dap. La histología sí indicó una enfermedad subyacente menor presente en algunos tejidos tratados y no tratados, que puede haber estado presente en estos pollos comerciales antes del inicio del estudio. Por lo tanto, fue difícil determinar si la enfermedad estaba asociada con el vector, el volumen de tratamiento (500 µl) o si los animales venían de una población enferma previamente.

[0086] Por esta razón, se decidió repetir este trabajo usando aves a las que se les dio solo la dosis de vector más alta (3,6e8 ufc por dosis de 500 µl) en comparación con las aves tratadas con 500 µl de PBS/Dap, aves que no fueron tratadas y aves recién llegadas de la operación comercial. El último grupo de aves fue incluido para determinar si la enfermedad encontrada en las aves no tratadas estaba presente antes de llegar o si la enfermedad se desarrolló después de llegar a la instalación de alojamiento. Brevemente, dos aves fueron asignadas de forma aleatoria a cada uno de los cuatro grupos. Con la excepción de las aves recién llegadas, que fueron sometidas a eutanasia y sometidas a necropsia al llegar, las aves en los tres grupos restantes fueron tratadas con vector, PBS/Dap o nada y observadas durante 14 días. El día 14, todas las aves fueron sometidas a eutanasia y sometidas a necropsia. En necropsia, ninguna de las aves en ninguno de los grupos presentó ninguna señal de enfermedad o anomalías y el patólogo que analizó los portaobjetos histológicos fue cegado para eliminar cualquier potencial sesgo. La histología reveló muy poca patología o infiltración de macrófagos en los pulmones, la tráquea y los sacos aéreos de cualquier ave que indicara una reacción adversa al vector o volumen de dosis, especialmente en las vías respiratorias y el intersticio. Se notó una inflamación perivascular moderada en algunos de los tejidos, pero la presentación fue mínima y aleatoria entre todos los grupos. Además, esta presentación no es inusual, considerando que estas aves son comerciales y no SPF.

[0087] Susceptibilidad a la exposición a H6N2 - En el piloto 3, diez pollos fueron inoculados con virus H6N2. Se recogieron frotis OP y se notó la enfermedad clínica. Aunque la mortalidad no era anticipada, se encontró un pollo muerto a los 7 dpi. A los 8 dpi, 6/9 pollos restantes fueron seropositivos para AIV después de un análisis AGID y los pollos fueron sometidos a eutanasia a los 10 dpi. El propósito de este piloto fue el de verificar la infección y la diseminación de H6N2 después de la exposición experimental. Por lo tanto, los frotis OP recogidos a los 3, 4 y 5 dpi fueron el primer y único grupo de muestras evaluadas usando una RT-qPCR. Los resultados revelaron diseminación en 7/10, 10/10 y 8/10 pollos a los 3, 4 y 5 dpi, respectivamente. Estos datos fueron suficientes para verificar la susceptibilidad de los pollos a la exposición a H6N2 y no se realizaron más análisis de RT-qPCR en las muestras restantes.

[0088] Actividad antivírica del vector en pollos experimentalmente inoculados - En el estudio POC final, grupos de aves fueron tratados profilácticamente con el vector de cóctel, vector aleatorio o se les dio un placebo (PBS/Dap) antes de la infección con el virus H6N2. Se recogieron frotis OP y se notó la enfermedad clínica a diario. A los 8 dpi, murió un pollo en el grupo PC. Este fue el único caso de mortalidad en todos los grupos. Los pollos restantes fueron sometidos a eutanasia a los 10 dpi. La sangre recogida antes de la eutanasia reveló que 4/10, 6/10 y 6/9 pollos con cóctel, con aleatorio y PC fueron seropositivos para AIV, respectivamente. La exposición a H6N2 produjo una enfermedad subclínica, ya que ninguno de los pollos presentó ninguna señal notable de enfermedad. Como tal, el sistema de puntuación de enfermedad clínica no se usó y las puntuaciones no se analizaron.

[0089] La protección del vector según se mide por una reducción acumulativa en el título de virus medio y la proporción de frotis OP positivos del total de frotis recogidos de pollos tratados con vector en comparación con pollos PC se muestra en la tabla 3. Esta tabla de datos brutos representa diferencias a través de todo el estudio sin ajustar en función del día. Se muestra una diferencia significativa en el título medio entre los pollos tratados con cóctel (1,5, 95% CI = 0, 3,0) y los pollos PC (4,1, 95% CI = 2,8, 4,8) (suma de rangos de Wilcoxon, p<0,0001). Asimismo, hay una diferencia significativa en el título medio entre los pollos tratados con el aleatorio (3,2, 95% CI = 0, 3,9) y los PC (p=0,003). Hay una diferencia significativa en la proporción de frotis OP positivos recogidos del grupo con cóctel, 36/70 (51%), en comparación con 58/70 (83%) del grupo PC (prueba exacta de Fisher, p<0,0001). Esta diferencia significativa fue observada también entre aves tratadas con el aleatorio (42/70, 60%) y las PC (p=0,002). Aunque no hay diferencia significativa en el título medio acumulativo o la proporción de frotis positivos entre los grupos con cóctel y con aleatorio, en ambas mediciones, el efecto antivírico en el grupo con cóctel es más profundo. La tabla 3 indica la protección del vector, pero no revela qué día durante la infección ocurren estas diferencias significativas.

Tabla 3 - Protección del vector según se mide por una reducción en el título de virus y la proporción de frotis OP positivos de pollos tratados con vector.

Grupo	(95% CI) ^a	Frotis OP positivos ^b
-------	-----------------------	----------------------------------

Cóctel	1,5 (0; 3,0)	36/70 (51%)
Aleatorio	3,2 (0; 3,9)	42/70 (60%)
PC	4,1 (2,8; 4,8)	58/70 (83%)
	Valor P ¹	Valor P ²
PC cóctel	< 0,0001	< 0,0001
PC aleatorio	0,003	0,002
Aleatorio cóctel	0,247	0,198

^a Representa el log EID₅₀ eq/mL del total de frotis OP recogidos durante el período de infección. ^b Número de frotis OP positivos/totales evaluados por RT-qPCR. ¹ Prueba de suma de rangos de Wilcoxon para la diferencia en los valores de títulos medios ($p < 0,05$). ² Prueba exacta de Fisher para la diferencia en la proporción de frotis positivos ($p < 0,05$).

- 5 [0090] La tabla 4 representa la protección del vector cada día. Para cada grupo de tratamiento, se muestran el pico y el rango del título, el título medio y las proporciones de diseminación en cada día posterior a la infección. La prueba de la suma de rangos de Wilcoxon para una diferencia en el título medio indica diferencias significativas entre los pollos tratados con el cóctel y los PC los días 3 y 4 posteriores a la infección. No se observa ninguna diferencia significativa en los títulos medios en cualquier día individual entre los pollos tratados con el aleatorio y los PC. Hay una diferencia significativa en la proporción de aves con diseminación en el grupo con cóctel (5/10) en comparación con el grupo PC (10/10) a los 3 dpi ($p=0,016$). Sin embargo, las diferencias en las proporciones de diseminación son insignificantes entre el grupo tratado con el aleatorio y el PC en cualquier día individual.

Tabla 4 - Protección del vector según se mide por una reducción en el título del virus y la proporción de pollos tratados con el vector que diseminan H6N2 por día.

Grupo	Días posteriores a la infección con el virus H6N2							
	0	2	3	4	5	6	7	10
CÓCTEL (n=10)								
Pico del título ^a	0	4,86	4,75	4,79	5,32	5,60	5,96	4,95
Rango del título ^b	0	2,2-4,9	2,3-4,8	2,4-4,8	1,5-5,3	1,4-5,6	3,2-6,0	2,3-4,9
Título medio (95% CI)	0	2,19 (0; 3,31)	1,15 (0; 4,43)	1,20 (0; 4,61)	0,77 (0; 4,82)	2,19 (0; 4,85)	1,60 (0; 5,27)	0 (0; 4,39)
Valor P†	N/A	0,105	0,05	0,042	0,089	0,147	0,18	1,0
proporción de diseminación	0/10	6/10	5/10	5/10	5/10	5/10	5/10	4/10
Valor P††	N/A	0,500	0,016	0,070	0,175	0,152	0,070	0,328
ALEATORIO (n=10)								
Pico del título ^a	0	5,03	4,96	6,00	5,17	5,14	4,88	3,75
Rango del título ^b	0	2,6-5,0	2,5-5,0	3,7-6,0	3,1-5,2	4,3-5,1	1,4-4,9	1,5-3,8
Título medio (95% CI)	0	2,97 (0; 4,43)	3,22 (0; 4,77)	3,92 (0; 5,23)	3,52 (0; 4,78)	4,39 (0; 4,84)	3,83 (0; 4,66)	0 (0; 3,28)
Valor P†	N/A	0,279	0,289	0,322	0,145	0,223	0,102	0,658
proporción de diseminación	0/10	6/10	7/10	6/10	6/10	6/10	7/10	4/10
Valor P††	N/A	0,500	0,105	0,152	0,314	0,152	0,291	0,328
+ CONTROL (n=10)								
Pico del título ^a	0	5,79	6,42	5,81	5,81	6,02	5,85	3,97
Rango del título ^b	0	3,0-5,8	1,5-6,4	1,7-5,8	2,8-5,8	2,1-6,0	1,8-5,9	1,4-4,0
Título medio (95% CI)	0	3,90 (0; 5,25)	4,05 (2,1; 5,2)	4,77 (2,0; 5,3)	4,57 (0,9; 5,5)	4,65 (2,3; 5,4)	4,82 (2,0; 5,6)	1,38 (0; 2,9)
proporción de diseminación	0/10	7/10	10/10	9/10	8/10	9/10	9/10	5/9*

- 15 ^a Los títulos representan valores de log EID₅₀ eq/mL. ^b Representa solo las aves que transmiten el virus. † Prueba de suma de rango de Wilcoxon para la diferencia en el título medio en comparación con el grupo de control positivo ($p < 0,05$). †† Prueba exacta de Fisher de un solo lado para la diferencia en la proporción de pollos con diseminación en el vector tratado en comparación con el grupo de control positivo ($p < 0,05$). * Un ave murió entre 7 y 10 dpi.

- 20 [0091] Los títulos de virus H6N2 medios y la proporción de pollos con diseminación de virus en cada intervalo diario se muestran en la figura 6. Mirando el gráfico de título medio por día que representa todos los pollos en cada grupo (incluidos aquellos sin diseminación), hay una tendencia distinta en la carga de virus diseminada entre los pollos

5 con cóctel y aquellos en el grupo con aleatorio y PC (FIG. 6A). Entre el día 2 y el 7 posteriores a la infección, los títulos medios tanto en el grupo con aleatorio como en el PC parecen aumentar, mientras que el título medio en el grupo con cóctel cae y continúa descendiendo hasta el día 5 posterior a la infección. El título en el grupo con cóctel aumenta brevemente a los 6 y los 7 dpi, pero la carga de virus diseminado sigue siendo muy inferior a la carga de virus diseminado de los pollos con aleatorio y los PC. Se observa una tendencia menos profunda cuando se representa el título medio por día representando aquellos pollos con diseminación en cada grupo (FIG. 6B). Aquí cada título medio representa la proporción diaria de pollos con diseminación de la figura 6C. Con la excepción de los días 3 y 10 posteriores a la infección, la carga media de virus diseminado diaria es menor en las aves con diseminación con cóctel en comparación con las PC. A pesar de este cambio aparente en el título de virus observado entre el grupo con cóctel y los PC en estos dos días, resulta importante reconocer que todavía un número superior de aves están diseminando (FIG. 6C) el día 3 y el 10 en el grupo PC (10/10 y 5/9) en comparación con el grupo con cóctel (5/10 y 4/10).

15 [0092] Como se espera y se observa, los títulos de diseminación medios de aves en cada grupo varían por día. Se observan diferencias significativas entre los títulos medios crudos (tabla 3), sin embargo, para determinar diferencias significativas a lo largo de todos los días posteriores a la infección, es necesario controlar el día en el análisis. La protección del vector según se mide por una reducción en el título medio se analiza usando una MLR, controlando el día (tabla 5). Independientemente del día posterior a la infección, hay una diferencia significativa en el título medio en los pollos PC en comparación con los pollos con cóctel ($p < 0,0001$) y en comparación con los con aleatorio ($p = 0,002$). En la mayoría de análisis y comparaciones hechos hasta este punto, la protección del tratamiento con cóctel tendía a ser superior en comparación con el tratamiento con aleatorio. Sin embargo, usando la MLR y controlando el día, esta diferencia es insignificante ($p = 0,251$).

Tabla 5 - Protección del vector según se mide por una reducción en el título medio de virus a lo largo de todos los días.

	Valor P †
25 Cóctel vs. PC	< 0,0001
Aleatorio vs. PC	0,002
Cóctel vs. Aleatorio	0,251

† Regresión lineal multivariante por diferencias entre los títulos medios, controlando el día ($p < 0,05$).

30 [0093] Se usaron análisis de regresión logística simple y múltiple para estimar la protección del vector según se mide por la probabilidad de diseminación de virus H6N2 en los pollos de control positivo en comparación con los pollos tratados con vector (tabla 6). Las OR, los 95% CI y el nivel de significación ($p < 0,05$) se computarizaron para cada día individual y después de controlar el día (a lo largo de todos los días). Con la excepción de a los 3 dpi, la probabilidad de diseminación en un día individual en los pollos PC no es significativa en comparación con los pollos tratados con cóctel o con aleatorio. La probabilidad de diseminación no pudo calcularse el día 3 posterior a la infección porque 10/10 (100%) pollos PC estaban diseminando virus. Cuando se controla el día, la probabilidad de diseminación de H6N2 entre los pollos PC es 4,83 (95% CI = 2,17, 10,72) superior en comparación con los pollos tratados con cóctel ($p < 0,0001$). En comparación con los pollos tratados con el vector aleatorio, la probabilidad de diseminación de virus detectable a lo largo de todos los días en los pollos PC es ligeramente menor (3,48; 95% CI = 1,57, 7,86), pero todavía significativa ($p = 0,003$). Aunque insignificante, a lo largo de todos los días la probabilidad de diseminación de virus en el grupo con aleatorio es 1,42 superior en comparación con la probabilidad de diseminación en el grupo con cóctel ($p = 0,303$).

Tabla 6 - Protección del vector según se mide por la probabilidad de diseminación de virus en los pollos de control positivo no tratados.

Grupo de referencia	Dpi	Control positivo no tratado				Vector aleatorio				
		OR ^a	LCL ^b	UCL ^c	Valor P ^d	OR	LCL	UCL	Valor P	
Vector cóctel	a lo largo de todos los días ^e	4,83	2,17	10,72	< 0,0001	1,42	0,73	2,8	0,303	
	2	1,55	0,24	9,91	0,640	1,0	0,17	5,98	1,0	
	3	--*	--	--	--	2,33	0,37	14,61	0,365	
	4	9,0	0,81	100,14	0,074	1,5	0,25	8,82	0,654	
	5	4,0	0,55	29,1	0,171	1,5	0,25	8,82	0,654	
	6	6,0	0,53	67,65	0,147	1,0	0,17	5,98	1,0	
	7	9,0	0,81	100,14	0,074	2,33	0,37	14,61	0,365	
	10	2,25	0,38	13,47	0,374	1,0	0,17	5,98	1,0	
	Vector aleatorio	a lo largo de	3,48	1,54	7,86	0,003				

todos los días ^e				
2	1,55	0,24	9,91	0,640
3	--	--	--	--
4	6,0	0,53	67,65	0,147
5	2,67	0,36	19,71	0,337
6	6,0	0,53	67,65	0,147
7	3,86	0,33	45,57	0,284
10	2,25	0,38	13,47	0,374

^a Proporción de probabilidades calculada mediante análisis de regresión logística. ^b Nivel inferior del intervalo de confianza al 95%. ^c Nivel superior del intervalo de confianza al 95%. ^d Calculado mediante análisis de regresión logística simple y múltiple ($p < 0,05$). ^e Controlando a lo largo de todos los días. * 10/10 pollos diseminando en el grupo PC no tratado; OR no es aplicable.

5 [0094] La protección del vector según se mide por una reducción log y factor de reducción en los títulos de
 10 diseminación y replicación se muestra en la tabla 7. Las diferencias en el título medio (log EID₅₀ eq/ml) entre los
 pollos tratados con vector y los PC se calcularon como la reducción log. Usando los valores medios geométricos,
 se calcularon los factores de reducción en los títulos de virus. Ambas de estas mediciones de reducción fueron
 15 computarizadas a lo largo de todos los días (usando el título medio no ajustado) y para cada día individual. A lo
 largo de todos los días, el tratamiento con cóctel se asocia con una reducción log media de 2,6 (factor de reducción
 398) en el título de virus diseminado en comparación con los pollos PC. Cada día individual posterior a la infección,
 el tratamiento con cóctel resultó en una reducción log media medible. Más notable es en los días 3, 4, 5, 6 y 7
 posteriores a la infección, donde la diseminación viral es de entre 2,5 y 3,8 logs medios inferior (de 288 a 6309
 veces inferior) en comparación con los pollos PC. Las reducciones log en la diseminación viral son mucho menos
 20 pronunciadas en los pollos tratados con el aleatorio. Sin embargo, en general todavía resultó en una reducción log
 media de 0,9 (factor de reducción de 7,9) y en cada día individual al menos una reducción log media de 0,3 (factor
 de reducción de 1,8). Lo más notable para el tratamiento con el vector aleatorio fue en el día 10 posterior a la
 infección (reducción log media de 1,4), que representa la reducción menos potente observada en el grupo con
 cóctel, también en el día 10 posterior a la infección.

20 Tabla 7 - Protección del vector según se mide por una reducción log y factor de reducción en los títulos de diseminación.

Grupo de tratamiento	Dpi	Reducción log ^a	Factor de reducción ^b	
Cóctel	A lo largo de todos los días ^c	2,6	398,1	
	2	1,7	51,3	
	3	2,9	794,3	
	4	3,6	3715,4	
	5	3,8	6309,6	
	6	2,5	288,4	
	7	3,2	1659,6	
	10	1,4	24,0	
	Aleatorio	A lo largo de todos los días	0,9	7,9
		2	0,9	8,5
3		0,8	6,8	
4		0,9	7,1	
5		1,1	11,2	
6		0,3	1,8	
7		1,0	9,8	
10		1,4	24,0	

^a Reducción en el título medio log EID₅₀ eq/ml en comparación con el control positivo. ^b Reducción en la mediana geométrica en comparación con el control positivo. ^c Basado en el log EID₅₀ eq/mL medio bruto no ajustado por día.

25 [0095] Centinelas - Se alojaron pollos naífs (n=2) con las aves tratadas con el cóctel desde el momento de
 administración del vector hasta los 10 días posteriores a la exposición con H6N2. De ambas de estas aves, solo se
 detectó un frotis OP positivo el día 7 posterior a la introducción (1,5 log EID₅₀ eq/ml). Todos los otros frotis recogidos
 entre el día 2 y el 10 posteriores a la infección de estas aves centinela fueron negativos. En general, 13/14 (92,8%)
 de los frotis OP recogidos de estas aves de contacto fueron negativos.

30 [0096] Este estudio es el primero en mostrar una transferencia y una invasión mediada por bacterias eficientes en
 el seno aviar, la tráquea y los tejidos pulmonares usando la plataforma de transferencia tkRNAi. La captación de
 RFP-vector se evaluó en dos puntos temporales, a las 15 y las 27 horas posteriores al tratamiento. Después de la

transferencia y la invasión de los tejidos respiratorios de pollo, se desconoce durante cuánto tiempo estos vectores suministrarían activamente ARNhc a estas células epiteliales receptoras no fagocíticas. Para mostrar la eficacia inicial, se decidió valorar y verificar la captación de vector transitoria para simular una protección viral en el plazo de 24 horas. Las imágenes capturadas en la figura 5 que muestran la localización del RFP-vector en los tejidos respiratorios en ambos puntos temporales fueron suficiente para concluir que la transferencia del vector y, teóricamente, la descarga del ARNhc precederían a la exposición viral.

[0097] La administración intranasal del vector aleatorio no estaba asociada con ninguna patogénesis observada dentro de los 14 días posteriores al tratamiento en comparación con el placebo (PBS/Dap) y las aves no tratadas. La falta de cualquier enfermedad clínica observada y los resultados de histopatología favorables sugieren que estos vectores fueron bien tolerados en la dosis administrada. Como un seguimiento se pudieron realizar estudios adicionales. El piloto 2 no probó si la patogénesis específica de tejido estaría presente si se administraran dosis de vector secuenciales a lo largo de varios días. Tampoco se evaluaron en este trabajo vías alternativas para medir cuantificablemente la respuesta al tratamiento con vector, incluyendo una caída en la producción de huevos para las aves ponedoras y la falta de aumento de peso en pollos de engorde. En un trabajo futuro, esta tecnología profiláctica podría incluir valoraciones más allá de los 14 días y después de múltiples dosis. Sin embargo, estos vectores son auxótrofos de Dap y, una vez administrados, incapaces de sobrevivir o proliferar en el exterior de un medio complementado. Es dudoso que se incurra en una respuesta inflamatoria crónica más allá de los 14 días debido a una falta de cualquier daño de tejido macroscópico o microscópico a las 2 semanas posteriores al tratamiento. Estos resultados piloto iniciales son prometedores e indican que el sistema tkRNAi es apropiado para la transferencia a tejido respiratorio aviar y no desencadena una respuesta inflamatoria que el huésped aviar no sea capaz de superar en 14 días.

[0098] El piloto 3 verificó que el virus H6N2 en la dosis de exposición era infeccioso en pollos ponedores comerciales de 5 semanas de edad. Esta dosis (10^6 EID₅₀/0,1 ml) es común para los ensayos de eficacia de la vacuna de la LPAI y otros estudios de exposición experimentales en pollos (Claes et al 2013, Pantin-Jackwood et al 2012, Abbas et al 2011). Juntos, los pilotos 1, 2 y 3 verificaron la captación de vector en 24 horas, identificaron una dosis de vector apropiada y un virus de exposición de LPAI óptimo. Estos parámetros fueron incorporados al estudio POC final.

[0099] Se administró profilácticamente a tres grupos de diez pollos el vector de cóctel, aleatorio o placebo y se inocularon con H6N2 a las 20 (± 2) horas posteriores al tratamiento. Los datos brutos presentados en la tabla 3 indican diferencias significativas en los títulos de diseminación y la proporción de frotis positivos recogidos a lo largo de todos los días posteriores a la infección cuando se comparan las aves tratadas con el cóctel o el aleatorio con las aves PC. Estos resultados están respaldados además cuando se realiza un análisis de MLR, controlando el día. Resulta interesante expandir estos resultados por día para identificar dónde y aludir a por qué estas diferencias están ocurriendo entre grupos de tratamiento. Tras la exposición a H6N2, parece que la proporción de pollos diseminando a los 2 dpi es relativamente similar; lo que significa que el éxito de la infección experimental fue relativamente igual en todos los grupos. Sin embargo, de las aves con diseminación el día 2, los títulos de diseminación son inferiores con el cóctel en comparación con las aves con aleatorio y PC. Adicionalmente, la diseminación de aves individuales (no presentada) indica que un ave tratada con cóctel estaba diseminando a los 2 dpi, pero paró de diseminar a un nivel detectable en los días posteriores. Intuitivamente esto tiene sentido porque el modo de acción del vector está dirigido a evitar la replicación, no la infección.

[0100] El día tres, mientras que las proporciones de diseminación en los grupos con aleatorio (7/10) y PC (10/10) parecen a aumentar, el grupo con cóctel cae significativamente a 5/10 y se estabiliza a lo largo de los días 3, 4 y 5. En apoyo de esta observación, los títulos de diseminación son significativamente diferentes los días 3 y 4 posteriores a la infección entre pollos tratados con cóctel y PC. De nuevo, mirando las tendencias de diseminación (FIG. 6A), el día 3 hasta el 5 posteriores a la infección los títulos medios caen en el grupo con cóctel, pero continúan aumentando hasta el día 7 posterior a la infección en los grupos con aleatorio y PC. Estas observaciones pueden explicar la actividad antivírica del ARNhc de NP y PA, interfiriendo con la replicación viral eficiente durante el periodo infeccioso. Hay una manera alternativa de interpretar estas observaciones. En el grupo tratado con cóctel, más pollos estaban diseminando virus a los 2 días posteriores a la infección en comparación con los días 3-5. Esto puede indicar que la protección del vector sería más eficaz si se administrara > 24 horas antes de la exposición, lo que permite un tiempo superior para descargar y procesar el ARNhc.

[0101] Los títulos de diseminación y las proporciones por día respaldan un modelo propuesto de protección del vector. Tras la entrada viral y la infección, el vector interfiere con la replicación viral, inhibiendo la proliferación de viriones infecciosos que continúan infectando células y tejidos vecinos. Esto reduce la carga viral infecciosa en los tejidos respiratorios, disminuyendo así la diseminación viral en cada pollo. Debido a que el AIV se transmite principalmente a través del contacto directo en pollos, esto evita una infección posterior de aves susceptibles en ese grupo. Juntos, estos hallazgos implican que el tratamiento con vector de cóctel interrumpe la replicación viral y la diseminación eficientes.

- 5 [0102] La duración de la diseminación influye directamente en el periodo infeccioso o el tiempo desde que el virus se detecta primero hasta cuando el virus ya no se detecta. Esto proporciona otra manera de valorar la protección del vector. Sin embargo, se puede discutir que la duración de la diseminación juega un papel menor en la transmisión en comparación con el título de diseminación. Un animal puede estar diseminando durante una duración más larga, pero los títulos de diseminación ser demasiado bajos para sostener una transmisión exitosa. Adicionalmente, la densidad de aves puede no sostener la transmisión, a pesar de periodos de diseminación más largos. Por esa razón, la duración de diseminación no se usa típicamente como una medición para evaluar la eficacia de la vacuna. Este estudio se terminó a los 10 dpi, a pesar de la diseminación continua entre los pollos en cada grupo. Por lo tanto, si el estudio hubiera continuado más allá de 10 días sería posible medir de manera precisa el efecto del vector en la duración de diseminación. Los vectores de cóctel redujeron los títulos de diseminación viral orofaríngeos, pero no parecen limitar la duración de la diseminación. Quizás esto indica que los vectores proporcionaron apropiadamente una protección transitoria pronto en el ciclo de infección, pero también puede indicar la necesidad de administrar una dosis de vector posterior, muy similar a una vacuna de refuerzo. Esto puede proteger adicionalmente a las aves susceptibles de aquellas infectadas, bloqueando así la cadena de transmisión.
- 10
- 15 [0103] Además de evaluar la duración de diseminación y las diferencias en los títulos de diseminación y las proporciones de diseminación, la probabilidad de diseminación de virus en los pollos PC en comparación con los pollos tratados con vector proporciona una manera alternativa de medir la protección del vector. Controlando a lo largo de todos los días posteriores a la infección, era 4,83 veces más probable que los pollos PC diseminaran el virus H6N2, en comparación con los pollos tratados con cóctel ($p < 0,0001$). También era más probable que los pollos PC diseminaran el virus en comparación con los pollos tratados con el aleatorio. Aunque estas razones de probabilidades proporcionan un mayor respaldo a la protección del vector, no son un método estandarizado para evaluar la eficacia de la vacuna en la industria.
- 20
- 25 [0104] La reducción cuantitativa en la replicación de un virus en la vía respiratoria es una medición crítica usada para evaluar la capacidad de un profiláctico para limitar la transmisión de un virus y controlar la enfermedad (Swayne y Kapczynski 2008). Para ser considerada clínicamente relevante, una vacuna del AIV debe demostrar una reducción mínima en los títulos de replicación y de diseminación de 10^2 EID₅₀ (2 log o 100 veces) menos virus de las vías respiratorias en las aves vacunadas en comparación con las no vacunadas (Suarez et al 2006), y/o la diferencia debería ser estadísticamente significativa (Swayne et al 1997). Aunque el vector aleatorio no demostró esta reducción mínima requerida, demostró una diferencia estadísticamente significativa en los títulos de diseminación a lo largo de todos los días (tabla 5). Con la excepción del día 2 y el 10 posteriores a la infección, los títulos de diseminación del vector de cóctel demostraron un mínimo de 2,5 log (288 veces) y un máximo de 3,8 log (6,309 veces) menos virus en comparación con las aves PC. A lo largo de todos los días, el grupo con cóctel anti-AIV estaba diseminando 398 veces menos virus infeccioso en comparación con el grupo PC. Estas mediciones fueron todas estadísticamente significativas. Basándose en ambos de estos criterios medibles, el tratamiento con vector de cóctel estaba dentro de los parámetros para considerar que proporciona una protección clínicamente relevante contra el AIV.
- 30
- 35
- 40 [0105] Varias otras mediciones se utilizan para valorar la protección de la vacuna. En aves vacunadas se evalúa a menudo la resistencia cuantificable después de la exposición con una dosis 10^2 a 10^5 EID₅₀ superior en comparación con aves no vacunadas (Swayne y Kapczynski 2008). Además, la enfermedad clínica tal y como se define por una caída en la producción de huevos en aves ponedoras puede medir cuantificablemente la protección. La producción de huevos no empieza hasta las 18-20 semanas de edad. Para simular la edad a la cual la industria típicamente aplica regímenes de vacuna, las aves utilizadas en este estudio tenían 4-6 semanas de edad. Por lo tanto, la medición de la producción de huevos no habría sido posible. Estudios futuros que utilicen este sistema de vectores usarían ambas de estas valoraciones para medir cuantificablemente la protección del vector. La prevención de la mortalidad es otra medición directa de la protección de la vacuna. La LPAI es por definición poco patógena y no se asocia a menudo a la mortalidad. Sin embargo, este virus H6N2 está bien adaptado a los pollos, contribuyendo a una mortalidad del 10% en los pollos PC y los pollos inoculados en el piloto 3. En cambio, los vectores de cóctel y aleatorio ambos parecieron evitar la mortalidad, ya que ninguna de las aves que recibieron cualquiera de estos vectores murió tras la infección con H6N2.
- 45
- 50 [0106] Finalmente, la prevención de la transmisión por contacto es un método directo para demostrar la eficacia protectora de una vacuna y la propensión para limitar la transmisión de campo. Por lo tanto, se pueden demostrar reducciones en la diseminación clínicamente relevantes mostrando una propagación reducida en aves en contacto, una práctica a menudo solicitada por las agencias reguladoras biológicas veterinarias nacionales. Es difícil valorar en marcos experimentales porque los factores que juegan un papel en la transmisión no están estandarizados. Estos factores incluyen la densidad de aves, la ventilación, la humedad, la temperatura, el virus de exposición y la dosis, la vía de administración, la edad en la exposición, la adaptación virus-huésped y el saneamiento de la cámara. Se ha sugerido la dosis intranasal en aves 50% infecciosa (BID₅₀) como una manera de valorar cuantificablemente el potencial del AIV para iniciar la infección y soportar la transmisión en pollos inoculados en un marco de laboratorio (Tumpey et al, 2004). En el presente estudio, se puede decir que las aves fueron inoculadas con una BID₅₀ apropiada para iniciar la infección y soportar la transmisión porque más del 50% de los pollos PC estaban
- 55
- 60

diseminando el virus. Dos pollos centinela naïfs, alojados con las aves tratadas con cóctel, sirvieron como una manera de controlar la propagación viral dentro de este grupo con una densidad de 1,0 ft² por ave. Con la excepción de un frotis positivo a los 7 días posteriores a la introducción, no se detectó ninguna transmisión ave a ave en los dos centinelas. El título detectado de este frotis estaba justo por encima del límite de detección del ensayo de RT-qPCR. Es posible que esta muestra positiva se debiera verdaderamente a la transmisión de H6N2. Sin embargo, también es posible que este frotis positivo esporádico fuera un resultado de la contaminación cruzada de los guantes durante la recogida o el ARN viral durante el procedimiento de extracción.

[0107] En un estudio de transmisión de laboratorio, los investigadores inocularon experimentalmente pollos SPF de 3 semanas de edad (n=10) con LPAI A/CK/HN/1/98 (H9N2) (Guan et al 2013). Cuando se alojan con una densidad de 0,5 ft² por ave, títulos virales OP medios de 2,1 log₁₀ EID₅₀ eq/ml a los 2 dpi fueron suficientes para la transmisión a pollos naïfs (n=2). Un segundo estudio inoculó por vía intranasal pollos Leghorn SPF de 46 semanas de edad (n=10) con 0,1 ml con 10⁶ EID₅₀ del virus A/chicken/CA/1255/02 (H6N2) y a los 3 dpi se añadieron dos aves centinela para controlar la transmisión por contacto (Pantin-Jackwood et al 2012). En los pollos inoculados, los títulos OP medios ± SD (log₁₀ EID₅₀ eq/ml) a los 2 y los 4 dpi fueron 4,8 ±0,5 y 5,3 ±0,5, respectivamente. A los 4 días posteriores a la introducción, ambos centinelas fueron positivos (títulos de 3,7 y 3,1 log₁₀ EID₅₀ eq/ml). Aunque no se presenta la densidad de aves en este estudio, los títulos de diseminación en las aves inoculadas son similares a aquellos títulos detectados en los pollos PC actuales en los días 2 y 4 posteriores a la infección. La protección del vector según se mide por un potencial de transmisión reducido habría sido mejor ilustrada si las aves centinela se hubieran alojado también con los pollos PC. Desafortunadamente, esto no fue posible ya que solo se proporcionaron dos aves extra por la granja comercial. Además de usar una BID₅₀ apropiada, estos estudios previos indican que los títulos de diseminación habrían sido adecuados para sostener la transmisión si los centinelas se hubieran alojado entre los pollos PC. Independientemente, parece que el vector de cóctel inhibió exitosamente la transmisión a estas aves de contacto. Para hacer cualquier inferencia válida acerca de la capacidad de estos vectores anti-AIV para romper la cadena de transmisión, se requiere un modelo de transmisión por contacto de laboratorio estandarizado para reproducir con más precisión un entorno de campo o de granja.

[0108] Las superficies mucosas de la vía respiratoria de las aves de corral son puertas de entrada conocidas para el AIV (Zarzaur y Kudsk 2001). Debido a que el AIV invade las superficies mucosas, la transferencia dirigida de estos vectores a las vías respiratorias mucosas en pollos es un beneficio añadido a la replicación viral dirigida. De esta manera, estos vectores podrían proporcionar una protección fuerte a la primera línea de defensa del huésped. Sin embargo, es importante considerar las preocupaciones sobre la activación inmunitaria, ya que hay pros y contras en la activación de una respuesta inmunitaria en los tejidos respiratorios. A diferencia de la microflora natural presente en los tractos GI de las aves de corral, es improbable que los tejidos respiratorios hayan desarrollado tolerancia inmunitaria contra los componentes bacterianos. Una respuesta inmunitaria moderada podría ser beneficiosa, especialmente contra la infección de la gripe. Esto puede ayudar a explicar la actividad antivírica asociada al tratamiento con el vector aleatorio.

[0109] Sin embargo, resulta importante evitar estimular una respuesta inmunitaria mucosa fuerte. Esto podría interferir con la eficacia de este vector aplicado por vía intranasal, especialmente si son necesarias múltiples dosis para una mejor protección contra el AIV. Después de concluir el trabajo POC, se supo que estas pollitas de 4 semanas de edad habían sido vacunadas a los 7 días de edad con la vacuna viva modificada Poulvac® *E. coli* (Zoetis, Florham Park, Nueva Jersey). Esta vacuna recién aprobada se ha estudiado para determinar su mecanismo de protección de amplio espectro contra la *Escherichia coli* patógena aviar (APEC). Cuando se administra por pulverización o por agua potable, parece que la vacuna estimula la producción de inmunoglobulina A específica de la APEC en los tejidos mucosos y la proliferación de células de memoria CD8, ambas de las cuales indican la activación del MHC de clase I que lleva a una respuesta celular, antes que una humoral (Filho et al 2013). La activación de una respuesta inmunitaria celular ayudaría a evitar una futura invasión tisular por APEC, especialmente en la vía respiratoria, ya que esta es la vía primaria de infección de la APEC (Sadeyen et al 2014). La vacunación pudo haber resultado en la inflamación mucosa a las 4 semanas de edad. Quizás la vacunación Poulvac® *E. coli* explica la enfermedad subyacente observada en el piloto 2 (primera ronda) y resultó en la inflamación y los agregados linfoides observados en los tejidos respiratorios tanto de las aves control como de las tratadas con vector.

[0110] Además de las preocupaciones sobre la inflamación mucosa inducida por la vacuna Poulvac® *E. coli*, una advertencia obvia a esta vacuna con *E. coli* es si afectó a la eficacia del vector evitando la invasión del vector del epitelio respiratorio mediante la activación de una respuesta mediada por células. Aunque esta preocupación es válida, se puede abordar de varias maneras. Las bacterias usadas en el sistema de vectores anti-AIV son de la cepa no móvil de *E. coli* CEQ221. Estas bacterias son un derivado de K-12, fenotípicamente rugosas, y aunque su lipopolisacárido tiene una estructura nuclear completa, carecen del antígeno O (Liu y Reeves 1994). Esto significa que estos vectores son defectuosos en la biosíntesis del antígeno O del LPS y pueden carecer de una expresión eficiente de LPS, dando como resultado niveles más bajos de LPS en sus membranas externas. Es, por lo tanto, improbable que la CEQ221 induzca una respuesta inmunitaria robusta. Las CEQ221 son bacterias no patógenas invasivas intracelulares y han sido genéticamente modificadas para reconocer células epiteliales mucosas. Estas

E. coli invasivas requieren la expresión de (β) 1integrina en la superficie de las células epiteliales mucosas. La entrada depende de que esta interacción invasina-receptor (β) 1integrina permita la captación bacteriana a través de la endocitosis mediada por receptor (Xiang et al 2006, Isberg y Barnes 2001, Conte et al 1994, Isberg y Leong 1990). Si no fuera por la expresión bacteriana genéticamente modificada de la proteína invasina, estas bacterias CEQ221 serían de otro modo extracelulares y reconocidas por células presentadoras de antígenos (APC) profesionales. Las células epiteliales no se caracterizan típicamente como APC profesionales. Debido a este sistema de reconocimiento de epitelio mucoso específico a causa de esto, es menos probable que las células dendríticas y otras APC interactúen o respondan a estos vectores. La CEQ221 es una auxótrofa de Dap y sufre una lisis rápida después de la invasión de células huésped. Aunque las CEQ221 fueran invasivas para las APC y otras células inmunitarias, la expresión de LLO después de la lisis bacteriana en el fagosoma interrumpiría la fusión entre el fagosoma de la célula y el lisosoma. Esta interrupción bloquearía la presentación del MHC de clase I y evitaría la activación de una respuesta inmunitaria mediada por células a través de la proliferación de células de memoria CD8 (Grillot-Courvalin et al 1998). Por lo tanto, estos vectores de CEQ221 no son adecuados para desarrollar una respuesta inmunitaria mediada por células o incluso una respuesta inmunitaria humoral. Estas características, o falta de las mismas, pueden explicar la capacidad de este vector para evadir la respuesta celular generada por la vacuna Poulvac® *E. coli* en estos pollos comerciales.

[0111] Si los animales utilizados en este estudio hubieran sido aves SPF, la protección del vector podría haberse medido más directamente. Sin embargo, para simular mejor la eficacia de este sistema de vectores en la práctica, se puede defender el uso de estas aves comerciales. En definitiva, es difícil descifrar los efectos que esta vacuna Poulvac® *E. coli* puede haber tenido sobre los vectores anti-AIV en este trabajo piloto preliminar. Sin embargo, si la vacuna con *E. coli* tuviera efectos nocivos, esto sugeriría que los resultados de este trabajo subestiman la protección del vector contra el AIV en pollos.

[0112] Si bien los resultados sugieren que el vector de cóctel proporcionó una mayor protección, no es inusual que el vector aleatorio por sí solo tenga capacidades antivirales. Estos vectores bacterianos son característicamente LPS rugosos; sin embargo, incluso niveles muy bajos de LPS pueden actuar como potenciadores inmunes (Bessler et al 1990). El LPS es comúnmente reconocido por los tejidos del huésped y estimula una respuesta inmunitaria innata. El reconocimiento del LPS puede conducir a vías de señalización aguas abajo en la cascada y que estimulan la producción de IFN de tipo I. Este escenario es probable dada alguna investigación previa relacionada con la bacteria *E. coli* CEQ508, un derivado de la cepa CEQ221 que sirve como vehículo de transferencia de vectores anti-AIV. En trabajos anteriores (Steinbach et al 2010), la dosificación oral con CEQ508 no provocó un aumento significativo en las citocinas proinflamatorias circulantes en ratones en comparación con las inyecciones de LPS. Sin embargo, estos vectores bacterianos estimularon niveles muy bajos de estas citocinas, incluyendo TNF- α , IL-6, MCP-1 e IL-12. Estas son todas las citocinas clave involucradas en la respuesta inmunitaria innata, un conocido mecanismo de defensa celular contra la infección viral, específicamente contra la gripe (García-Sastre y Biron 2006). Cuando estos vectores bacterianos se administraron por vía intranasal a los pollos, es muy posible que estos vectores desencadenaran una respuesta innata, resultante en una protección adicional contra el H6N2 y la replicación y la diseminación. La producción de citocinas proinflamatorias durante esta activación innata aumentaría la capacidad de cualquier célula huésped no infectada para resistir una nueva infección por virus recién generado.

[0113] Como se ha presentado y comentado, hay varias formas de medir y describir la protección de vectores de este estudio POC. Al observar ya sea las diferencias en las proporciones de diseminación, los títulos de diseminación o las razones de probabilidades tanto por día como a lo largo de todos los días, ha aparecido un patrón similar. En comparación con los controles positivos, los pollos tratados profilácticamente con el vector de cóctel anti-AIV quedaron protegidos después del experimento de inoculación con H6N2. Aunque los análisis fueron insignificantes en cualquier día individual, en general (a lo largo de todos los días) se relacionó una protección significativa con el tratamiento con el vector aleatorio. No obstante, la protección contra el vector aleatorio fue menos profunda, lo que sugiere que el vector de cóctel tiene un mayor potencial antiviral. Es probable que esta protección adicional se deba a la doble acción antiviral del ARNhc de NP y PA.

[0114] De media, entre los días 3-7 posteriores a la infección, el 48% de los pollos tratados con el vector de cóctel no diseminaban. En contraste, solo el 10% de los pollos del grupo PC no diseminaban. Los resultados que analizan las reducciones en el título de diseminación mostraron que el vector de cóctel proporcionó una protección clínicamente relevante.

[0115] Como se ha indicado antes, el objetivo a largo plazo de este trabajo es desarrollar esta tecnología antigripal en forma de un profiláctico que contribuya al desarrollo de un método de control más eficaz y robusto para el AIV en aves de corral. El desarrollo exitoso de esta tecnología no solo reduciría la carga económica que los brotes tienen en la industria y en los países en desarrollo, sino que también reduciría directamente el riesgo de transmisión a los humanos y proporcionaría una prueba de concepto a la comunidad científica y médica para desarrollar un profiláctico antigripal similar para los humanos. Al igual que con el desarrollo de cualquier tecnología nueva, se necesitan estudios adicionales y no debe subestimarse. Este trabajo demuestra la eficacia protectora de estos

vectores anti-AIV contra la gripe aviar en pollos y proporciona un fuerte argumento para la evaluación continua de esta tecnología.

Gen	Secuencia de la cadena sentido (5'-3')	SEC ID NO.
NP	GGA TCT TAT TTC TTC GGA G	1
PA	GCA ATT GAG GAG TGC CTG A	2
PB1	GAT CTG TTC CAC CAT TGA A	9
PB2	CGG GAC TCT AGC ATA CTT A	10

AIV ARNip	Diana de AIV ARNm (5'-3')	Hebra sentido de ARNip (5'-3')	Hebra antisentido de ARNip (5'-3')
ARNip-NP	GGATCTTATTTCTTCGGAG	GGATCTTATTTCTTCGGAG-dTdT	CTCCGAAGAAATAAGATCC-dTdT
ARNip-PA	GCAATTGAGGAGTGCCTGA	GCAATTGAGGAGTGCCTGA-dTdT	TCAGGCACTCCTCAATTGC-dTdT
ARNip-PB1	GATCTGTTCCACCATTGAA	GATCTGTTCCACCATTGAA-dTdT	TTCAATGGTGGAAACAGATC-dTdT
ARNip-PB2	CGGGACTCTAGCATACTTA	CGGGACTCTAGCATACTTA-dTdT	TAAGTATGCTAGAGTCCCG-dTdT

5

ARNhc AIV	5' – hebra sentido – horquilla (TTCAAGAGA) – hebra antisentido - cola poli-T – 3' (hebra superior)
ARNhc-NP (superior)	GGATCTTATTTCTTCGGAG-TTCAAGAGA-CTCCGAAGAAATAAGATCC-TTTTTTTTTT
ARNhc-NP (inferior)	CCTAGAATAAAGAAGCCTC-AAGTTCTCT-GAGGCTTCTTTATTCTAGG-AAAAAAAAAA
ARNhc-PA (superior)	GCAATTGAGGAGTGCCTGA-TTCAAGAGA-TCAGGCACTCCTCAATTGC-TTTTTTTTTT
ARNhc-PA (inferior)	GCGTAACTCCTCACGGACT-AAGTTCTCT-AGTCCGTGAGGAGTTAACG-AAAAAAAAAA
ARNhc-PB1 (superior)	GATCTGTTCCACCATTGAA-TTCAAGAGA-TTCAATGGTGGAAACAGATC-TTTTTTTTTT
ARNhc-PB1 (inferior)	CTAGACAAGGTGGTAACTT-AAGTTCTCT-AAGTTACCACCTTGTCTAG-AAAAAAAAAA
ARNhc-PB2 (superior)	CGGGACTCTAGCATACTTA-TTCAAGAGA-TAAGTATGCTAGAGTCCCG-TTTTTTTTTT
ARNhc-PB2 (inferior)	GCCCTGAGATCGTATGAAT-AAGTTCTCT-ATTCATACGATCTCAGGGC-AAAAAAAAAA

ARNhc AIV	5' – hebra sentido – horquilla (TTCAAGAGA) – hebra antisentido - cola poli-T – 3' (hebra superior)
ARNhc-NP (superior)	GGATCTTATTTCTTCGGAG-TTCAAGAGA-CTCCGAAGAAATAAGATCC-TTTTTTTTTT
ARNhc-NP (inferior)	CCTAGAATAAAGAAGCCTC-AAGTTCTCT-GAGGCTTCTTTATTCTAGG-AAAAAAAAAA
ARNhc-PA (superior)	GCAATTGAGGAGTGCCTGA-TTCAAGAGA-TCAGGCACTCCTCAATTGC-TTTTTTTTTT
ARNhc-PA (inferior)	GCGTAACTCCTCACGGACT-AAGTTCTCT-AGTCCGTGAGGAGTTAACG-AAAAAAAAAA
ARNhc-PB1 (superior)	GATCTGTTCCACCATTGAA-TTCAAGAGA-TTCAATGGTGGAAACAGATC-TTTTTTTTTT
ARNhc-PB1 (inferior)	CTAGACAAGGTGGTAACTT-AAGTTCTCT-AAGTTACCACCTTGTCTAG-AAAAAAAAAA
ARNhc-PB2 (superior)	CGGGACTCTAGCATACTTA-TTCAAGAGA-TAAGTATGCTAGAGTCCCG-TTTTTTTTTT
ARNhc-PB2 (inferior)	GCCCTGAGATCGTATGAAT-AAGTTCTCT-ATTCATACGATCTCAGGGC-AAAAAAAAAA
ARNhc-aleatorio (superior)	AGGTCGCTTAGTCGAGAAG-TTCAAGAGA-CTTCTCGACTAAGCGACCT-TTTTTTTTTT

ARNhc-aleatorio (inferior)	TCCAGCGAATCAGCTCTTC-AAGTTCTCT-GAAGAGCTGATTCGCTGGA- AAAAAAAAAA
-------------------------------	--

GLOSARIO DE TÉRMINOS DE LO REIVINDICADO

- 5 [0116] El término "administración" y sus variantes (por ejemplo, "administrar" un compuesto) en referencia a un compuesto de la invención significa introducir el compuesto en el sistema del sujeto que necesita tratamiento. Cuando se proporciona un compuesto de la invención en combinación con uno o más de otros agentes activos (por ejemplo, una vacuna para el AIV, etc.), se entiende que la "administración" y sus variantes incluyen la introducción simultánea y secuencial del compuesto y otros agentes.
- 10 [0117] Como se usa en el presente documento, el término "composición" pretende abarcar un producto que comprende los ingredientes especificados en las cantidades especificadas, así como cualquier producto que resulte, directa o indirectamente, de la combinación de los ingredientes especificados en las cantidades especificadas.
- 15 [0118] El término "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, significa la cantidad de compuesto activo o agente farmacéutico que provoca la respuesta biológica o medicinal en un tejido, sistema, animal o humano buscada por un investigador, veterinario, médico u otro clínico. En referencia a la infección por AIV, una cantidad eficaz comprende una cantidad suficiente para evitar contraer la enfermedad o para reducir la gravedad de la enfermedad según se manifiesta a través de los síntomas clínicos, el título viral o la diseminación del virus por el sujeto, o según se manifiesta a través de la capacidad para prevenir o reducir la transmisión entre animales. En algunas formas de realización, una cantidad eficaz es una cantidad suficiente para retrasar la aparición de síntomas o para prevenir la enfermedad. En algunas formas de realización, una cantidad eficaz es una cantidad suficiente para disminuir los títulos virales y/o reducir la diseminación viral. Se puede administrar una cantidad eficaz en una o más dosis.
- 20 [0119] El término "tratar el AIV" o "tratamiento del AIV" se refiere a la administración a un animal, específicamente a aves de corral, en riesgo de contraer el AIV y se refiere a un efecto que alivia la enfermedad al inhibir la replicación del AIV, pero también a un efecto que resulta en la reducción de los síntomas clínicos, del título viral y/o de la diseminación viral.
- 25 [0120] Como se usa en este documento, "tratamiento" se refiere a la obtención de resultados clínicos beneficiosos o deseados. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, uno o más de: alivio de uno o más síntomas, disminución de la extensión del AIV, estado estabilizado (es decir, sin empeoramiento) del AIV, prevención o retraso de la propagación (por ejemplo, diseminación) del AIV, prevención, retraso o ralentización de la progresión del AIV, y/o mantenimiento del peso/aumento del peso o la producción de huevos, preservando así la producción animal. Los métodos de la invención contemplan uno o más de estos aspectos del tratamiento.
- 30 [0121] Un "sujeto que necesita tratamiento" es un animal en riesgo de contraer el AIV.
- [0122] Un componente "farmacéuticamente aceptable" es uno que es adecuado para su uso con humanos y/o animales sin efectos secundarios adversos indebidos (como toxicidad, irritación y respuesta alérgica) proporcionales a una relación beneficio/riesgo razonable.
- 35 [0123] Una "cantidad segura y eficaz" se refiere a la cantidad de un componente que es suficiente para producir una respuesta terapéutica deseada sin efectos secundarios adversos indebidos (como toxicidad, irritación o respuesta alérgica) proporcional a una relación beneficio/riesgo razonable cuando se usa en de la forma según esta invención.
- 40 [0124] Como se usa a lo largo de toda la solicitud, los términos "un" y "una" se usan en el sentido de "al menos uno/a", "al menos un/a primer/a", "uno/a o más" o "una pluralidad" de los componentes o pasos mencionados, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, el término "una célula" incluye una pluralidad de células, incluyendo mezclas de las mismas.
- [0125] El término "y/o", cuando se usa en este documento, incluye el significado de "y", "o" y "todos o cualquier otra combinación de los elementos conectados por dicho término".
- 45 [0126] Como se usa en el presente documento, la expresión "que comprende" pretende significar que los productos, composiciones y métodos incluyen los componentes o pasos a los que se hace referencia, pero no se excluyen otros. "Consistente esencialmente en", cuando se usa para definir productos, composiciones y métodos, significará

que se excluyen otros componentes o pasos de cualquier importancia esencial. Por lo tanto, una composición consistente esencialmente en los componentes mencionados no excluiría contaminantes traza y vehículos farmacéuticamente aceptables. "Consistente en" significará que se excluyen más que elementos traza de otros componentes o pasos.

5 [0127] Como se usa en el presente documento, el término "invasivo/a", cuando se refiere a un microorganismo, por ejemplo, una bacteria o partícula terapéutica bacteriana (BTP), se refiere a un microorganismo que es capaz de transferir al menos una molécula, por ejemplo, una molécula de ARN o de ADN que codifica ARN, a una célula diana. Un microorganismo invasivo puede ser un microorganismo capaz de atravesar una membrana celular, entrando así al citoplasma de dicha célula y transfiriendo al menos parte de su contenido, por ejemplo, ARN o ADN
10 que codifica ARN, en la célula diana. El proceso de transferencia de al menos una molécula a la célula diana preferiblemente no modifica significativamente el aparato de invasión.

[0128] Los microorganismos invasivos incluyen microorganismos que son naturalmente capaces de transferir al menos una molécula a una célula diana, por ejemplo al atravesar la membrana celular, por ejemplo, una membrana de una célula eucariota, y de entrar en el citoplasma, así como microorganismos que no son naturalmente invasivos y que han sido modificados, por ejemplo, genéticamente modificados, para ser invasivos. En otra forma de realización preferida, un microorganismo que no es naturalmente invasivo se puede modificar para convertirlo en invasivo mediante la unión de la bacteria o BTP a un "factor de invasión", también denominado "factor de entrada" o "factor de direccionamiento al citoplasma". Tal como se usa en el presente documento, un "factor de invasión" es un factor, por ejemplo, una proteína o un grupo de proteínas que, cuando se expresa por una bacteria no invasiva o BTP, hace que la bacteria o BTP sea invasiva. Tal como se usa en el presente documento, un "factor de invasión" está codificado por un "gen de direccionamiento al citoplasma". Los microorganismos invasores se han descrito generalmente en la técnica, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. con n.º de publicación US 20100189691 A1 y US20100092438 A1 y en Xiang, S. et al., Nature Biotechnology 24, 697-702 (2006).

[0129] En una forma de realización preferida, el microorganismo invasivo es *E. coli*, como se explica en los ejemplos de la presente solicitud. Sin embargo, se contempla que podrían adaptarse microorganismos adicionales para que funcionen como vectores tkRNAi para la transferencia de ARNip anti-AIV. Estas bacterias y BTP no virulentas e invasivas poseerían propiedades invasivas, o estarían modificadas para poseer propiedades invasivas, y pueden entrar a una célula huésped de mamífero a través de diversos mecanismos. A diferencia de la absorción de bacterias o BTP por parte de fagocitos profesionales, que normalmente da como resultado la destrucción de la bacteria o BTP dentro de un lisosoma especializado, las bacterias invasoras o las cepas de BTP tienen la capacidad de invadir células huésped no fagocíticas. Algunos ejemplos naturales de tales bacterias intracelulares son *Yersinia*, *Rickettsia*, *Legionella*, *Brucella*, *Mycobacterium*, *Helicobacter*, *Coxiella*, *Chlamydia*, *Neisseria*, *Burkholderia*, *Bordetella*, *Borrelia*, *Listeria*, *Shigella*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Porphyromonas*, *Treponema* y *Vibrio*, pero esta propiedad también se puede transferir a otras bacterias o BTP como *E. coli*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* o Bifidobacterias, incluyendo los probióticos a través de la transferencia de genes relacionados con la invasión (P. Courvalin, S. Goussard, C. Grillot-Courvalin, C.R. Acad. Sci. París 318, 1207 (1995)). Los factores que deben tenerse en cuenta o abordarse al evaluar especies bacterianas adicionales como candidatas para su uso como vectores tkRNAi incluyen la patogenicidad, o la falta de ella, de la candidata, el tropismo de las bacterias candidatas para la célula diana o, alternativamente, el grado en que las bacterias se pueden modificar genéticamente para transferir ARNip al interior de una célula diana, y cualquier valor sinérgico que las bacterias candidatas puedan proporcionar al activar la inmunidad innata del huésped.

[0130] Los virus de la gripe aviar son enfermedades que representan amenazas importantes para la salud animal y humana y son una fuente de diversidad genética que permite la aparición de la gripe pandémica. Como se usa en este documento, la gripe aviar es una gripe que afecta negativamente al menos a algunas aves de corral al causar síntomas de gripe y posiblemente la muerte de las aves de corral. El hecho de que algunas aves de corral puedan ser portadoras del virus de la gripe sin presentar síntomas de gripe o sin que la salud de las aves de corral se vea afectada negativamente no altera el hecho de que la gripe es una gripe aviar y es una enfermedad siempre que la gripe afecte negativamente la salud de al menos algunas aves de corral. Tal como se usa en este documento, se dice que un ave de corral que contrae el virus de la gripe aviar y que no presenta síntomas y/o que actúa como portadora del virus ha contraído la enfermedad de la gripe aviar. Un ave de corral contrae el virus de la gripe aviar cuando el virus está en el cuerpo del ave de corral.

[0131] Como se usa en el presente documento, se previene una enfermedad antes o después de que las aves de corral se hayan expuesto a la enfermedad, si (1) se administra una composición de medicamento a un animal internamente (por ingestión, inhalación, inyección, etc.), tópicamente (en la piel para su absorción en el cuerpo), o de otro modo, y si (2) la composición del medicamento evita que las aves de corral contraigan la enfermedad y experimenten síntomas normalmente asociados con la enfermedad, o, si las aves de corral contraen la enfermedad y experimentan o no experimentan en diversos grados de gravedad algunos o todos los síntomas normalmente asociados con la enfermedad, las aves de corral se recuperan de la enfermedad hasta alcanzar un estado saludable normal. De manera similar, el riesgo de propagación de la gripe aviar se reduce si se reduce la propagación del

virus por parte de las aves de corral (por ejemplo, títulos de diseminación reducidos) independientemente de si las aves de corral sobreviven a la infección con el virus de la gripe aviar. Como se ha comentado antes, uno de los objetivos principales de la presente invención es detener o reducir la propagación de la gripe aviar, reducción que puede abordarse mediante la reducción de la transmisión a partir de aves de corral infectadas a otros animales o humanos.

5

[0132] Como se usa en el presente documento, una enfermedad se trata si una composición de medicamento se administra a aves de corral después de que las aves de corral hayan contraído una enfermedad. Como se ha señalado anteriormente, un ave de corral que contrae una enfermedad puede presentar o no síntomas asociados con la enfermedad.

10 [0133] Los síntomas producidos en las aves de corral por la gripe aviar varían desde una enfermedad leve hasta una forma "altamente patógena" altamente contagiosa y rápidamente mortal de la enfermedad que puede producir epidemias graves. La gripe aviar altamente patógena se caracteriza por un inicio repentino, grave y muerte rápida, y una mortalidad que puede acercarse al 100%.

15 [0134] Por "kit" se entiende cualquier fabricación (por ejemplo, un envase o un contenedor) que comprende al menos un reactivo, por ejemplo, un tampón de pH de la invención. El kit puede publicitarse, distribuirse o venderse como una unidad para realizar los métodos de la presente invención. Además, los kits pueden contener un prospecto que describe el kit y los métodos para su uso. Cualquiera o todos los reactivos del kit se pueden proporcionar dentro de contenedores que los protegen del ambiente externo, como en contenedores o bolsas sellados.

20 [0135] La práctica de la presente invención puede emplear, a menos que se indique lo contrario, técnicas y descripciones convencionales de química orgánica, tecnología de polímeros, biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro de la habilidad de la técnica. Dichas técnicas convencionales incluyen síntesis de matriz polimérica, hibridación, ligamiento y detección de hibridación usando una etiqueta. Se pueden obtener ilustraciones específicas de técnicas adecuadas haciendo referencia a los ejemplos anteriores en este documento. Sin embargo, también se pueden utilizar otros procedimientos convencionales equivalentes. Dichas técnicas y descripciones convencionales se pueden encontrar en manuales de laboratorio estándar como Genome Analysis: A Laboratory Manual Series (Vols. I-IV), Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cells: A Laboratory Manual, PCR Primer: A Laboratory Manual y Molecular Cloning: A Laboratory Manual (todos de Cold Spring Harbor Laboratory Press), Stryer, L. (1995) Biochemistry (4^a ed.) Freeman, N.Y., Gait, "Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach" 1984, IRL Press, Londres, Nelson y Cox (2000), Lehninger, Principles of Biochemistry 3^a ed., W.H. Freeman Pub., Nueva York, N.Y. y Berg et al. (2002) Biochemistry, 5^a ed., W.H. Freeman Pub., Nueva York, N.Y.

25

30

[0136] En una forma de realización ventajosa, los contenedores del kit pueden incluir además un vehículo farmacéuticamente aceptable. El kit puede incluir además un diluyente estéril, que preferiblemente se almacena en un recipiente adicional separado. En otra forma de realización, el kit comprende además un prospecto que comprende instrucciones impresas que indican el uso de un tratamiento combinado de un tampón de pH y el agente anti-AIV como un método para tratar la gripe aviar en un sujeto. El kit también puede comprender contenedores adicionales que comprenden agentes antigripales adicionales (por ejemplo, amantadina, rimantadina y oseltamivir), agentes que potencian el efecto de dichos agentes u otros compuestos que mejoran la eficacia o la tolerabilidad del tratamiento.

35

40

LISTADO DE SECUENCIAS

[0137]

<110> Colorado State University Research Foundation

<120> SILENCIAMIENTO DE ARNIP MEDIADO POR E. COLI DE LA GRIPE AVIAR EN POLLOS

45 <130> 2076.35.PR2C

<140> 14/604,252

<141> 23-01-2015

<160> 18

<170> versión de PatentIn 3.5

5 <210> 1
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

<400> 1
 ggatcttatt tcttcggag 19

10 <210> 2
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

<400> 2
 gcaattgagg agtgcctga 19

15 <210> 3
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

<400> 3
 ctccgaagaa ataagatcc 19

20 <210> 4
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

25 <400> 4
 tcaggcactc ctcaattgc 19

<210> 5
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> NP del virus de la gripe con secuencia de ARNhc.

<400> 5
 ggatcttatt tcttcggagt tcaagagact ccgaagaaat aagatcc 47

35 <210> 6
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> NP del virus de la gripe con secuencias de ARNhc y cola poli-T.

<400> 6
 ggatcttatt tcttcggagt tcaagagact ccgaagaaat aagatccttt tttttt 57

45 <210> 7
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 796 930 T3

<220>
 <223> PA de la gripe con secuencia de ARNhc.

5 <400> 7
 gcaattgagg agtgcctgat tcaagagatc aggcactcct caattgc 47

<210> 8
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Virus de la gripe PA con secuencias de ARNhc y cola poli-T.

<400> 8
 gcaattgagg agtgcctgat tcaagagatc aggcactcct caattgctt tttttt 57

15 <210> 9
 <211> 10
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia en horquilla.

<400> 9
 ttcaagagat 10

25 <210> 10
 <211> 10
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Secuencia de cola poli-T.

<400> 10
 tttttttt 10

35 <210> 11
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

<400> 11
 gatctgtcc accattgaa 19

40 <210> 12
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

<400> 12
 cgggactcta gcatactta 19

45 <210> 13
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

50 <400> 13
 ttcaatggtg gaacagatc 19

ES 2 796 930 T3

<210> 14
<211> 19
<212> ADN
<213> Virus de la gripe

5 <400> 14
tcaggcactc ctcaattgc 19

<210> 15
<211> 47
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> PB1 del virus de la gripe con secuencia de ARNhc.

15 <400> 15
gatctgtcc accattgaat tcaagagatt caatgggtgga acagatc 47

<210> 16
<211> 57
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> PB1 del virus de la gripe con secuencias de ARNhc y cola poli-T.

<400> 16
gatctgtcc accattgaat tcaagagatt caatgggtgga acagatcttt tttttt 57

25 <210> 17
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> PB2 del virus de la gripe con secuencia de ARNhc.

<400> 17
cgggactcta gcatacttat tcaagagata agtatgctag agtcccg 47

35 <210> 18
<211> 57
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Secuencia de PB2 de la gripe con secuencias de ARNhc y cola poli-T.

<400> 18
cgggactcta gcatacttat tcaagagata agtatgctag agtcccgttt tttttt 57

REIVINDICACIONES

- 5 1. Bacteria *E. coli* no patógena que comprende un vector procariótico, donde dicho vector comprende una molécula de ADN que codifica uno o más ARNip y un promotor para controlar la transcripción del ARNip, donde los ARNip interfieren con una o más moléculas de ARN viral de gripe aviar y donde la bacteria está diseñada para expresar al menos un factor de invasión.
2. Bacteria *E. coli* no patógena según la reivindicación 1 donde el factor de invasión es al menos un gen *inv* y al menos un gen *hlyA*.
3. Bacteria *E. coli* no patógena según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 donde el ARNip interfiere con un ARNm de NP, PA, PB1 o PB2.
- 10 4. Bacteria *E. coli* no patógena según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 donde el ARNip comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14.
- 15 5. Bacteria *E. coli* no patógena según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 donde el vector procariótico es un plásmido que codifica un transcrito que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 15 y SEQ ID No. 17.
6. Bacteria *E. coli* no patógena según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 donde el promotor es seleccionado del grupo que consiste en un promotor T7, un promotor T3 y un promotor SP6.
- 20 7. Bacteria *E. coli* no patógena según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 donde el ARNip reconoce una secuencia conservada, donde la secuencia conservada está compartida por una pluralidad de subtipos de gripe aviar.
8. Bacteria *E. coli* no patógena según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 donde el vector procariótico es un plásmido que codifica el gen *inv* y el gen *hlyA*.
9. Composición farmacéutica que comprende la bacteria *E. coli* no patógena según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 25 10. Composición farmacéutica según la reivindicación 9, donde la composición es adecuada para la administración intranasal o por pulverización como un aerosol adecuado para la inhalación.
11. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10, que comprende una pluralidad de poblaciones de bacteria *E. coli* donde cada población de *E. coli* está diseñada para expresar una molécula de ARNip diferente que interfiere con una o más moléculas de ARN viral de gripe aviar.
- 30 12. Composición farmacéutica que comprende una primera bacteria *E. coli* no patógena según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y una segunda bacteria *E. coli* no patógena según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la primera bacteria *E. coli* no patógena comprende un vector procariótico, donde dicho vector comprende una molécula de ADN que codifica un promotor y un primer ARNip, donde el primer ARNip codificado interfiere con una o más moléculas de ARN viral de gripe aviar y el promotor controla la transcripción del primer ARNip, donde la
- 35 segunda bacteria *E. coli* no patógena comprende un vector procariótico, donde dicho vector comprende una molécula de ADN que codifica un promotor y un segundo ARNip, donde el segundo ARNip codificado interfiere con una molécula de ARN viral de gripe aviar diferente y el promotor controla la transcripción del segundo ARNip, las bacterias primera y segunda en un portador farmacéuticamente aceptable.
- 40 13. Composición farmacéutica según la reivindicación 12 donde la primera secuencia de ARNip codificada comprende SEQ ID No. 3 y la segunda secuencia de ARNip codificada comprende SEQ ID No. 4.
14. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, para usar en el tratamiento o la reducción del riesgo de propagación de la gripe aviar en un ave o aves de corral.
- 45 15. Vector procariótico según la reivindicación 1, donde el vector procariótico es un plásmido que codifica uno o más ARNip, un promotor para controlar la transcripción de los ARNip y al menos un factor de invasión, donde los ARNip interfieren con el ARNm de un virus de gripe aviar.

16. Vector procariótico según la reivindicación 15 donde el ARNip interfiere con un ARNm de NP, PA, PB1 o PB2.

17. Vector procariótico según la reivindicación 15 donde el ARNip comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14.

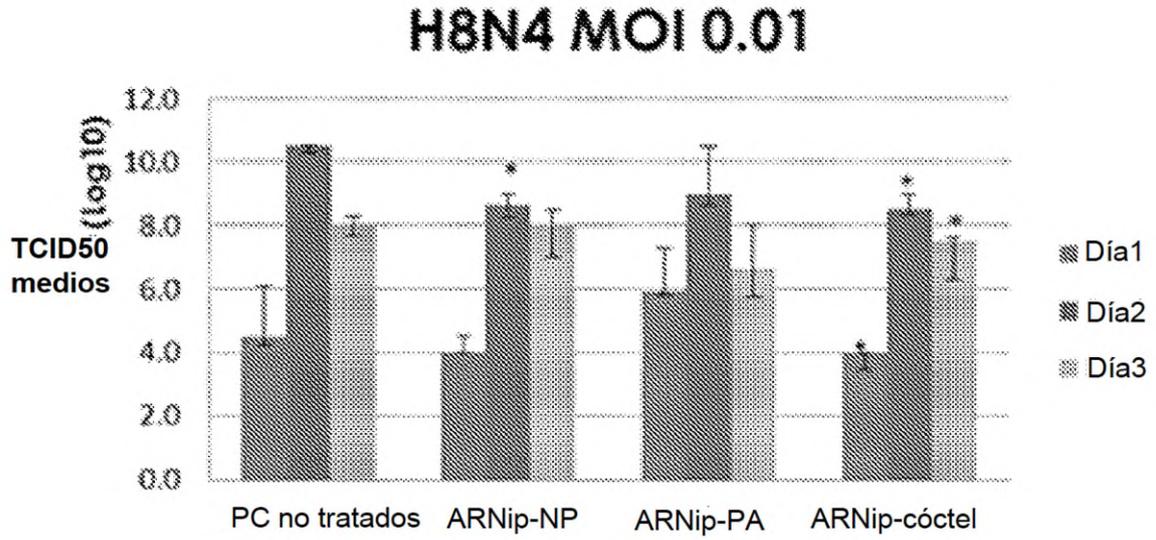


FIG. 1A

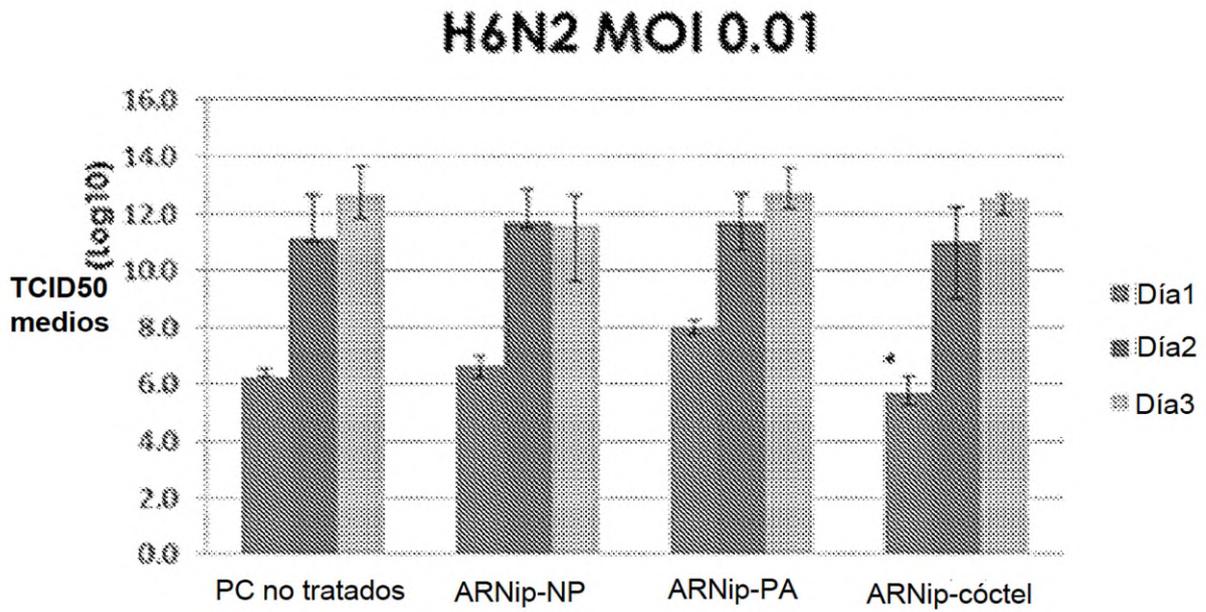


FIG. 1B

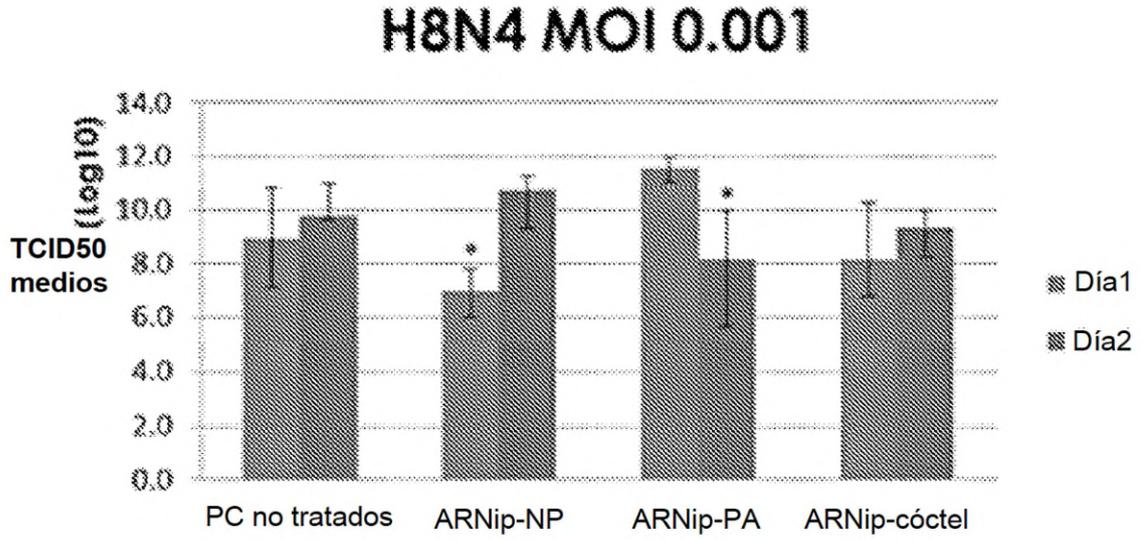


FIG. 1C

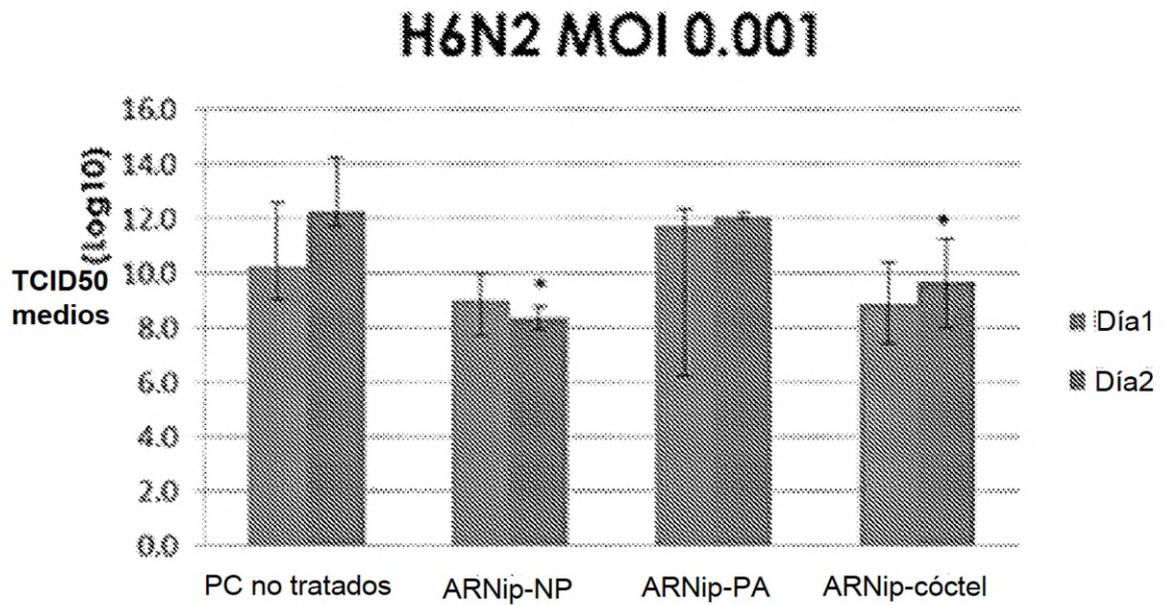


FIG. 1D

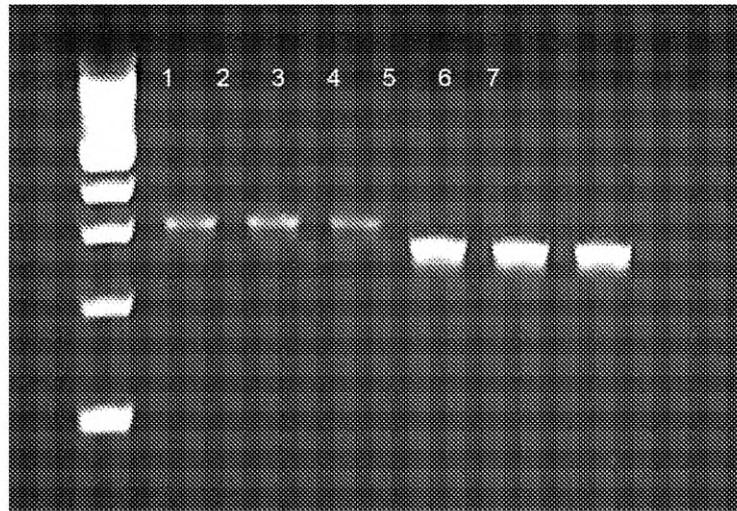


FIG. 2

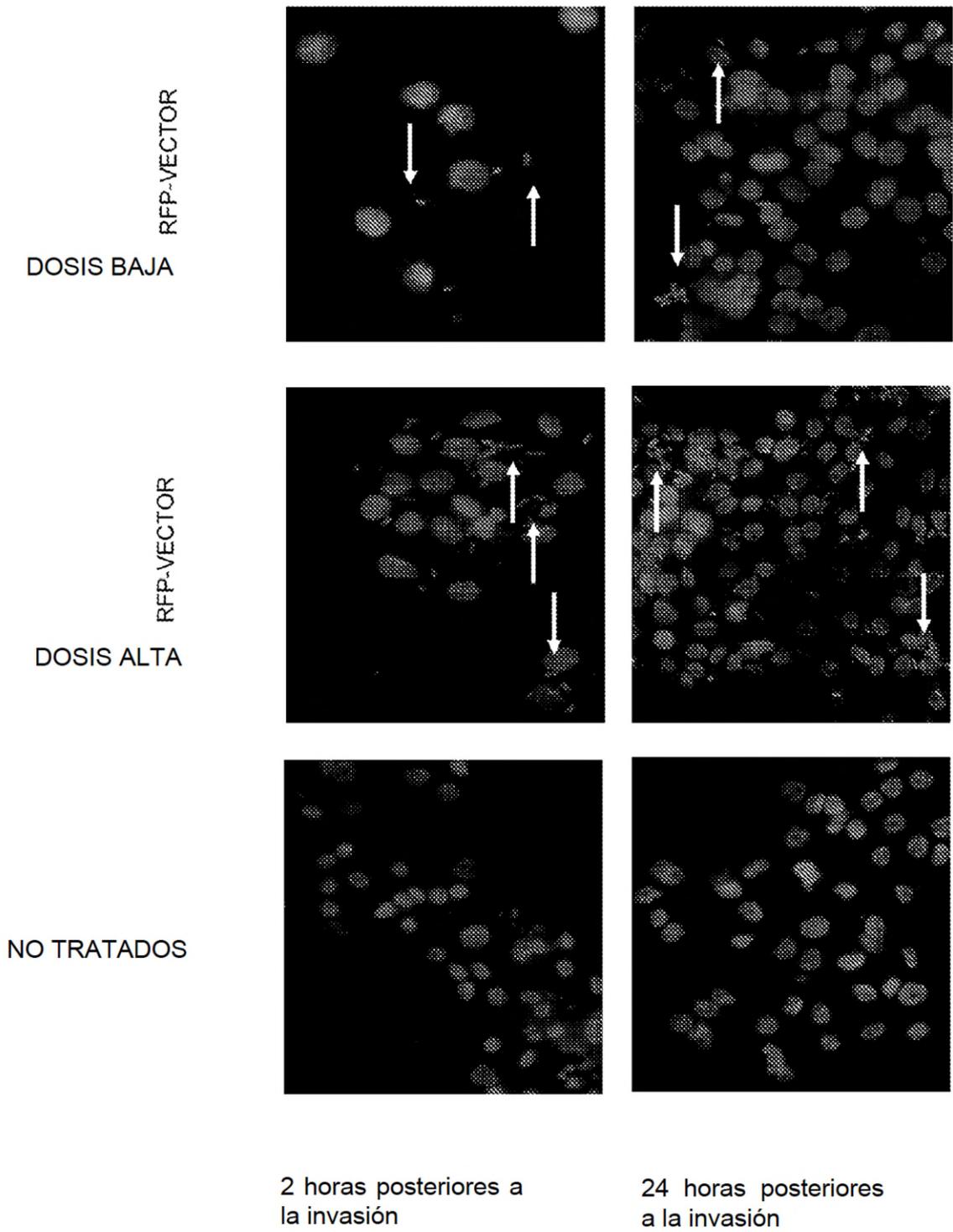


FIG. 3

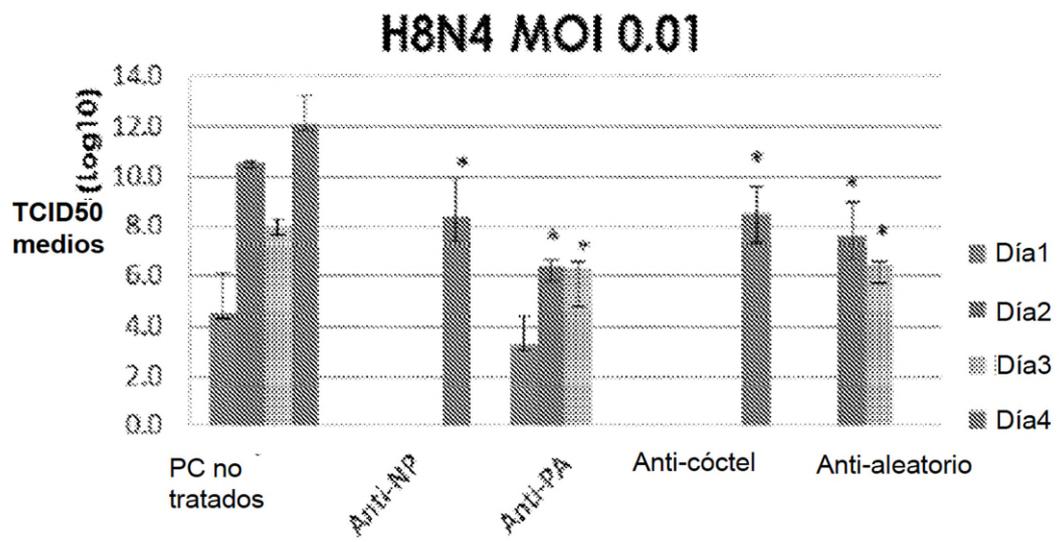


FIG. 4A

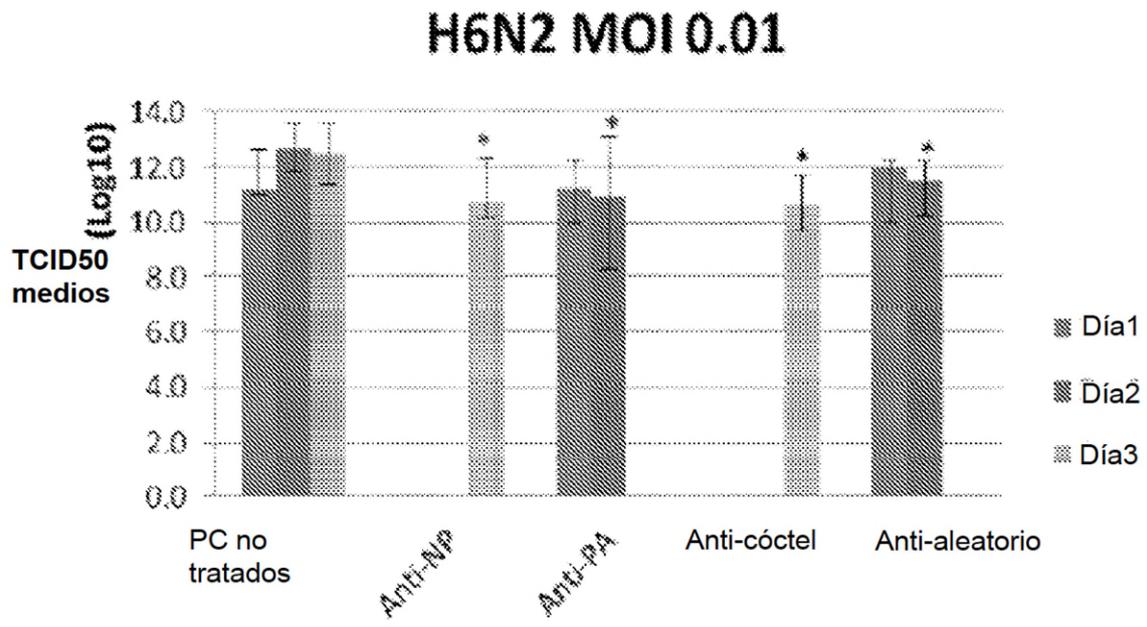


FIG. 4B

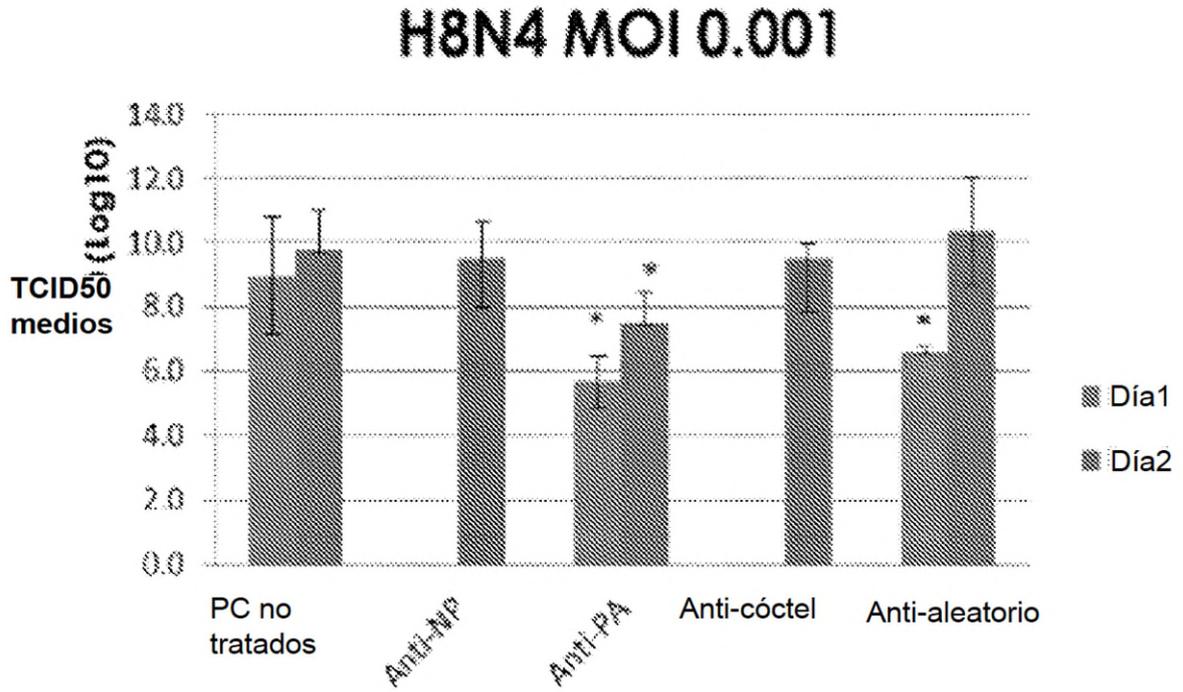


FIG. 4C

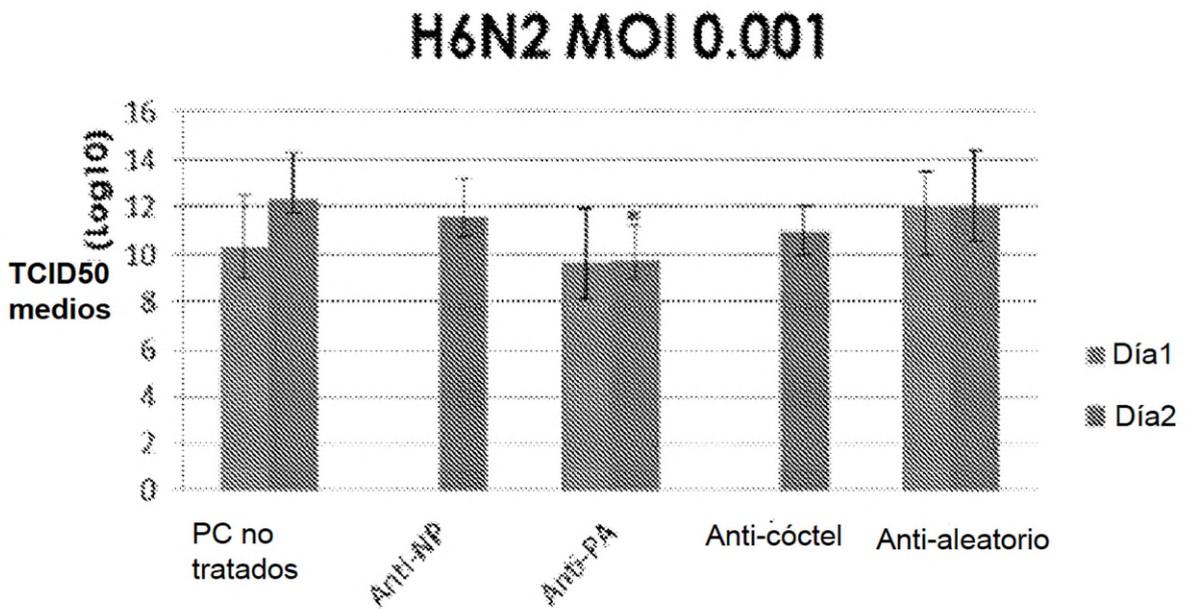


FIG. 4D

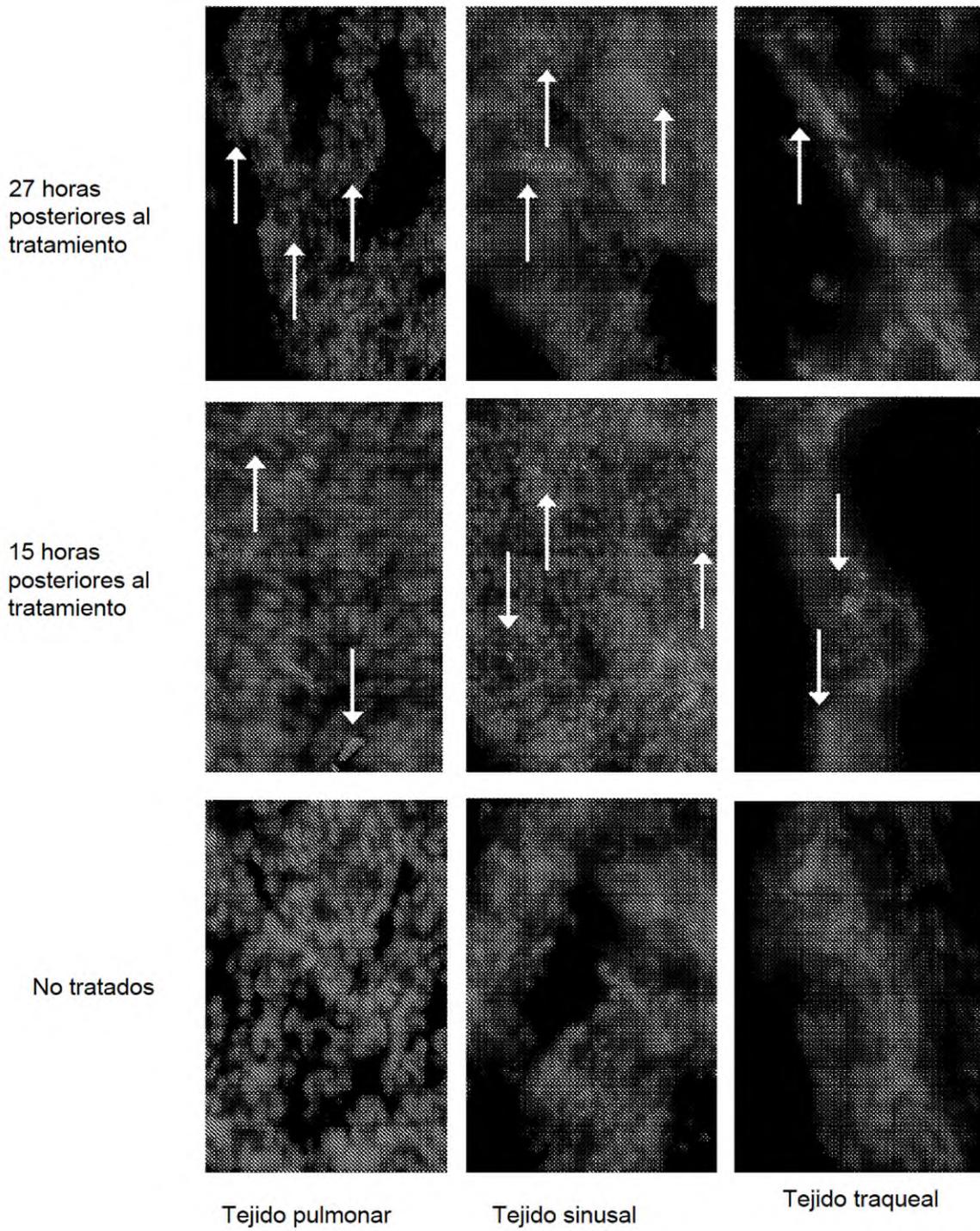


FIG. 5

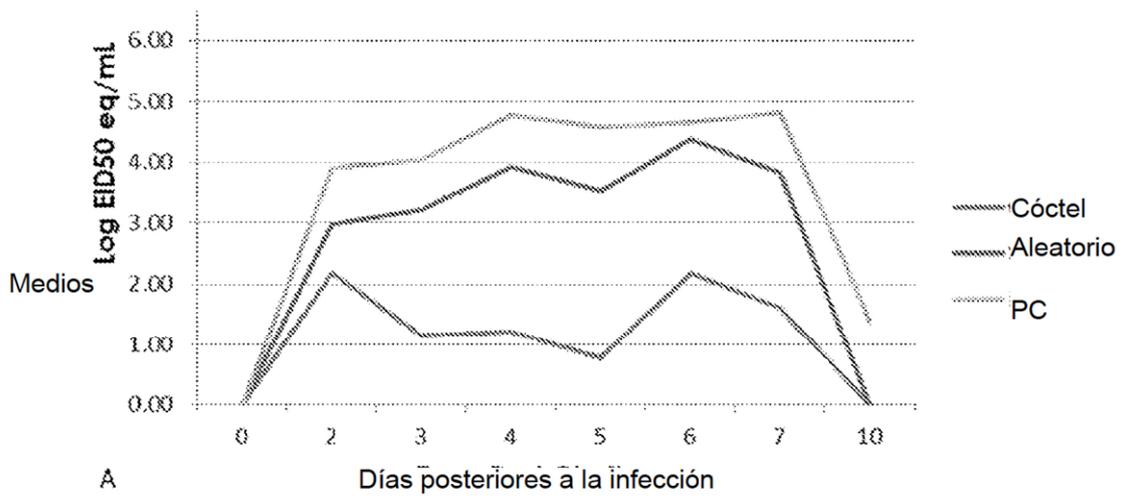


FIG. 6A

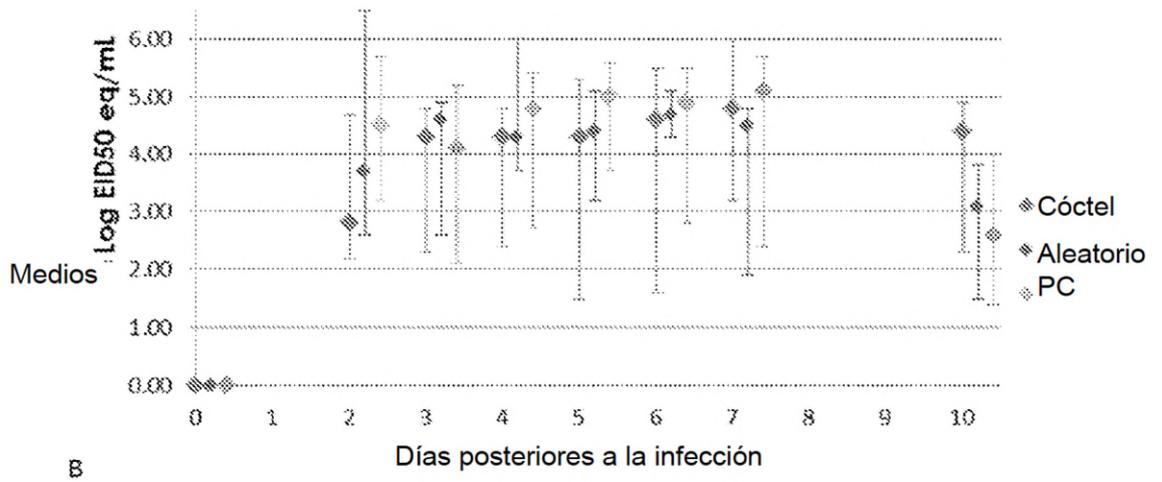


FIG. 6B

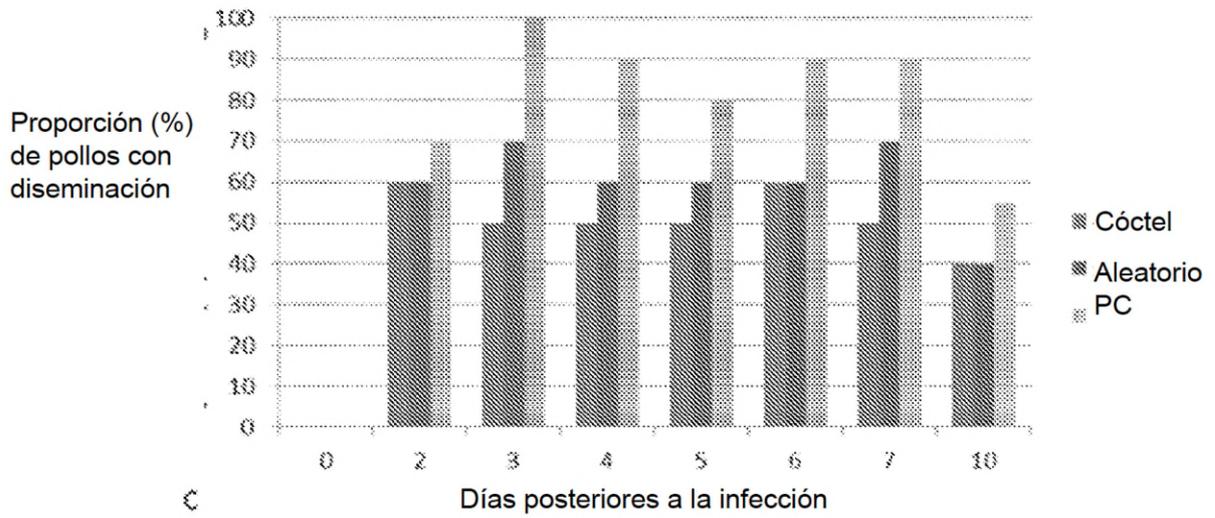


FIG. 6C