

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 913 063**

51 Int. Cl.:

A61K 35/76 (2015.01)

C12N 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.01.2015 PCT/GB2015/050094**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.07.2015 WO15107357**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.01.2015 E 15701244 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2022 EP 3094338**

54 Título: **Ensayo y medicamento**

30 Prioridad:

16.01.2014 GB 201400752

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

31.05.2022

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**DIMMOCK, NIGEL J. y
EASTON, ANDREW J.**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 913 063 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

Ensayo y medicamento

5 Campo de la invención

La presente divulgación se refiere a nuevos virus de interferencia defectuosos que son eficaces como agentes antivíricos.

10 Antecedentes de la invención

El genoma de la gripe A consiste en 8 segmentos de ARN monocatenario de sentido negativo (ARNv) en forma de complejos de ribonucleoproteína (RNP). Se requiere la inclusión de una copia de cada uno de los 8 segmentos para hacer una partícula de virus infecciosa.

Durante el transcurso de la replicación vírica, pueden generarse genomas de progenie que contienen deleciones extensas. Al menos algunos de estos genomas truncados contienen las señales necesarias para empaquetar el ácido nucleico en partículas de virus. Sin embargo, los genomas truncados en sí mismos no pueden generar partículas de virus infecciosos y, por lo tanto, son funcionalmente defectuosos. Algunos genomas defectuosos son capaces de interferir con el crecimiento del virus parental del que derivaron. La capacidad de tales genomas de interferencia defectuosos (DI) para interferir con la replicación del virus ha llevado a sugerir que pueden usarse como base para un nuevo enfoque de la terapia antivírica.

Las infecciones por el virus de la gripe pueden generar pequeños segmentos de ARN DI que pueden interferir con la replicación del virus. La mayoría de los ARN DI de la gripe tienen una deleción interna importante (aproximadamente el 80 %) y retienen las señales que actúan en cis necesarias para la replicación y el empaquetamiento en partículas de virus. El ARN DI se incorpora a una partícula de virus DI, pero la partícula de virus DI resultante no puede replicarse de forma autónoma ya que el ARN eliminado es incapaz de sintetizar la proteína normalmente codificada por el segmento de longitud completa. Por tanto, la replicación de un virus DI requiere la complementación por virus infecciosos.

La replicación del genoma del virus de la gripe comienza con la síntesis de copias de sentido positivo (ARNc) de los segmentos de ARNv del virus infectante y estos a su vez se usan como moldes para la síntesis de nuevos ARNv. Los ARNv también se usan como molde para la transcripción de ARNm. A diferencia de la síntesis de ARNc, la síntesis de ARNm se inicia usando un cebador escindido del extremo 5' con protección terminal del ARNm hospedador y su síntesis termina antes del final del ARNv molde, antes de la poliadenilación. Por lo tanto, el ARNm difiere del ARNc en que tiene la extensión 5' derivada del cebador y en que está truncado y poliadenilado en el extremo 3'. Los extremos no codificantes de cada segmento son cruciales para la síntesis de ARN y contienen, conservadas, aproximadamente 12 secuencias de nucleótidos (nt) en los extremos 5' que se complementan casi exactamente en los extremos 3'.

La síntesis del ARN del virus de la gripe se lleva a cabo mediante una ARN polimerasa dependiente de ARN codificada por el virus presente dentro de cada complejo RNP que consiste en el ARNv o ARNc fuertemente asociado con la nucleoproteína (NP) del virus. La ARN polimerasa vírica comprende un heterotrímero de proteínas PB1, PB2 y PA, que están codificadas por los segmentos 2, 1 y 3 del ARNv, respectivamente.

Se ha avanzado poco en la comprensión del mecanismo de interferencia de los virus DI generados por eliminación. Para los ARN DI generados por una deleción central, la interferencia con la síntesis de ARN podría implicar una competición específica entre el ARN DI del que deriva y el ARN genómico por un factor o factores víricos o del hospedador limitantes y/o el ARN DI mucho más corto puede tener una tasa de síntesis más rápida que su ARN genómico afín dándole una ventaja competitiva, aunque hay poca evidencia experimental para apoyar esto.

La mayoría de los estudios de interferencia mediada por el virus de la gripe DI hasta la fecha se han realizado con preparaciones naturales y están comprometidos por la presencia de mezclas de varias secuencias de ARN defectuosas diferentes. Este problema se ha resuelto recientemente usando genética inversa para generar cepas de virus que contienen un ARN DI definido molecularmente (Dimmock *et al.* 2008). Uno de estos ARN DI es 1/317, derivado del segmento 1 de un virus de la gripe A aviar H7N7. Esto estaba presente en un virus no clonado que interfería con el empaquetamiento del ARN pero no tenía un efecto perceptible en la síntesis del ARN vírico (Duhaut y McCauley 1996). Aunque el 1/317 ARN DI clonado, administrado por vía intranasal como una partícula del virus de la gripe, tiene actividad protectora en ratones, era 100 veces menos activo que 1/244 ARN DI, derivado del segmento 1 de un virus humano H1N1, en el mismo sistema de administración (Dimmock *et al.* 2008). La inoculación de ratones con el virus 1/244 DI confirió protección completa frente a un desafío letal con varios subtipos diferentes del virus de la gripe A (protección homóloga) (Dimmock *et al.* 2008). Sin embargo, se desconoce la base molecular de la protección por el virus 1/244 DI. Además de la protección contra los virus de la gripe A, el virus 1/244 DI también protege contra el virus heterólogo de la gripe B y un paramixovirus murino de manera dependiente de la dosis (Easton *et al.* 2011; Scott *et al.* 2011). La protección heteróloga (pero no homóloga) depende del interferón tipo I.

Scott *et al.* (Vaccine, Elsevier 29.38 (2011): 6584-6591) desvelan que el virus de la gripe de interferencia defectuoso confiere solo una protección de corta duración contra la enfermedad del virus de la gripe y proporciona evidencia de un papel para la inmunidad adaptativa en la protección mediada por el virus D1 *in vivo*. Noble *et al.* (Virology 210.1 (1995): 9-19) desvelan la caracterización de ARN A/WSN de interferencia (D1) defectuosos putativos aislados de los pulmones de ratones protegidos de una infección respiratoria letal por el virus de la gripe A/WSN (H1N1).

Sumario

La presente invención proporciona un virus de la gripe A de interferencia defectuoso clonado o recombinante para su uso en un método de tratamiento o profilaxis de infecciones por virus respiratorios,

en donde el virus de la gripe A de interferencia defectuoso clonado o recombinante comprende ARN derivado del segmento 1, 2 o 3,
en donde dicho ARN comprende:

- (a) un ARN de entre 300 y 600 nucleótidos de longitud;
- (b) al menos 100 nucleótidos de los extremos 5' y 3' del segmento 1, 2 o 3; y
- (c) una delección central de nucleótidos de dicho segmento;

en donde dicho virus de la gripe de interferencia defectuoso es capaz de interferir con la producción de ARN de los segmentos 1, 2 y 3 de la gripe A y
en donde dicho virus de la gripe de interferencia defectuoso no es 1/244.

La presente invención ha identificado que la eficacia de un virus de la gripe A DI para interferir con la replicación del virus de la gripe A puede atribuirse a la capacidad del ARN del virus DI de interferir con la producción de ARN no solo del segmento del que deriva el ARN del virus DI, sino también de interferir con la producción de ARN de todos los segmentos 1, 2 y 3. Como tal, en el presente documento se desvelan nuevos métodos para identificar virus de interferencia defectuosos que pueden usarse como agentes antivíricos eficaces. También, los presentes inventores proporcionan novedosos virus de interferencia defectuosos.

La presente divulgación también ha identificado que la producción de proteínas a partir del ARN del virus DI no es necesaria para la actividad de interferencia. En consecuencia, se desvela en el presente documento un ARN de virus DI en el cual el ARN del segmento eliminado se muta aún más para evitar la expresión de proteína, por ejemplo, por delección o mutación de uno o más codones de iniciación AUG.

En el presente documento se desvela un método para identificar un agente antivírico que comprende monitorizar la producción de ARN de los segmentos 1, 2 y 3 del virus de la gripe A en presencia de un ARN del virus de la gripe de interferencia defectuoso en la prueba, en donde un ARN de virus de interferencia defectuoso que interfiere con la producción de ARN de cada uno de los segmentos 1, 2 y 3 se identifica como un agente antivírico.

También se desvela en el presente documento un virus de la gripe A de interferencia defectuoso clonado o recombinante que comprende ARN derivado del segmento 1, 2 o 3, en donde dicho ARN comprende:

- (a) un ARN de entre 300 y 600 nucleótidos de longitud;
- (b) al menos 100 nucleótidos de los extremos 5' y 3' del segmento 1, 2 o 3;
- (c) una delección central de nucleótidos de dicho segmento;

en donde dicho virus de la gripe de interferencia defectuoso es capaz de interferir con la producción de ARN de los segmentos 1, 2 y 3 de la gripe A.

También se describe un agente antivírico identificado de acuerdo con la presente divulgación, o un virus de interferencia defectuoso de la invención para su uso en un método de tratamiento o profilaxis de la infección por gripe A.

También se desvela en este documento un ARN de virus de interferencia defectuoso, en donde el ARN está mutado para evitar la expresión de cualquier proteína codificada, por ejemplo, en donde uno o más codones de iniciación AUG están mutados. Un virus DI tal puede usarse en un método de tratamiento o profilaxis de la infección por gripe A.

Descripción de las figuras

FIGURA 1. Diagrama esquemático de 1/244 ARN DI de la gripe y otros ARN expresados a partir de plásmidos. Los números indican las posiciones de los nucleótidos de los diversos puntos de ruptura en los ARN del genoma eliminado usados en el estudio (sentido positivo, 5' a 3'). Las flechas continuas indican los cebadores usados en los ensayos de extensión de cebadores para los análisis de ARNc y ARNm y las flechas discontinuas indican los cebadores usados para los análisis de ARNv. El recuadro negro en el segmento 1-GFP ARN indica la posición del gen indicador GFP.

FIGURA 2. Análisis de transferencia Northern de los ARN víricos de la gripe producidos en ausencia y en presencia de ARN DI de la gripe. Se transfectaron células 293T con cantidades crecientes del plásmido 1/244 DI Poll (0, 0,1, 0,5 y 1,0 µg) y una cantidad constante de los plásmidos necesarios para la expresión del virus A/WSN infeccioso (véase el texto). Después de la transfección, las células se cocultivaron con células MDCK. El ARN se extrajo de células cocultivadas y de partículas de virus de la gripe purificadas a partir de fluidos de cultivo. (a) El ARN extraído de los lisados celulares (panel superior) y las partículas de virus de los sobrenadantes (panel inferior) a los 1, 2 y 3 días posteriores al cocultivo se analizaron con sondas específicas para el segmento 1 ARN y 1/244 ARN DI y para el segmento 7 de ARNV. Los tamaños de los marcadores de ARN se muestran a la izquierda y la identidad de cada especie de ARN se muestra a la derecha. (b) Infectividad de A/WSN en sobrenadantes celulares medida mediante ensayo de microplaca. Se muestran las infectividades en 1 (■), 2 (▲) y 3 (●) días después del cocultivo. Los datos muestran la media de 2 experimentos independientes representando la barra el intervalo. (c) El ARN del lisado celular y el ARN del virión extraídos el día 3 también se analizaron con sondas específicas para el segmento 2 y de segmento 7 de ARN. (d) Comparación de la relación del segmento 1 de ARN en viriones: células transfectadas en los días 2 (■) y 3 (●) y del segmento 2 de ARN en viriones: células transfectadas el día 3 (▼). Los datos se normalizaron frente a los niveles del segmento 7 y se expresaron como una fracción de la relación virión: ARN celular en ausencia de 1/244 ARN DI.

FIGURA 3. Ensayo de fluorescencia para determinar la expresión del segmento 1 de gripe en presencia de ARN DI de la gripe u otros ARN de gripe de longitud completa. Las células 293T se transfectaron con el plásmido segmento 1-GFP, plásmidos que expresan proteínas PB1, PB2, PA y NP y cantidades crecientes de un plásmido Poll adicional que expresa un ARN DI (1/244, 2/265 o 3/262) o un ARNV completo (segmento 4 o 6). Dos días después de la transfección, las células se examinaron en busca de fluorescencia. (a) Pares de imágenes de monocapa celular tomadas por microscopía de contraste de fase (izquierda) y epifluorescencia (derecha). A la izquierda se muestra la cantidad de cada plásmido que expresa los diversos ARN usados como inhibidores putativos. Las células control (arriba) se transfectaron con un vector vacío (1 µg). (b) Cuantificación de la fluorescencia en células generadas en presencia de plásmidos transfectados que expresan 1/244 ARN (columnas negras) y segmento 6 de ARN (columnas blancas). Las columnas muestran la media de 3 experimentos independientes y las barras son errores estándar de la media. Los análisis estadísticos se realizaron usando una prueba de la *t* de Student de dos colas y se muestran los valores de *p* para comparaciones específicas.

FIGURA 4. Análisis de la síntesis de ARN dirigida al segmento 1 de gripe por extensión de cebador en presencia de ARN DI de la gripe o segmento 6 de ARN. Las transfecciones se llevaron a cabo como se describe para la Figura 3. Análisis de extensión de cebadores de los niveles de ARN vírico dirigidos por el segmento 1-GFP en ausencia o en presencia de una cantidad creciente de plásmidos que codifican 1/244 ARN DI (a) o segmento 6 del genoma de ARNV (c). También se muestra el ARNr 5S detectado a partir de las mismas preparaciones de ARN y se usó como control interno. Los productos de extensión de imprimación se identifican a la izquierda de cada panel. En (b) y (d) se muestra la cuantificación de los niveles de ARN vírico de tres experimentos independientes mediante análisis de fosfoimagen. Los valores de las intensidades de las bandas se normalizaron frente al ARNr 5S relevante y se expresan como un porcentaje del valor máximo para cada ARN analizado. Los niveles basales de ARNV generados a partir del plásmido diana se restaron del total. Las barras de error representan el error estándar de la media de al menos 3 réplicas. ARNV (■), ARNm (▲) y ARNc (▼).

FIGURA 5. Análisis de la síntesis de ARN dirigida al segmento 6 de gripe por extensión de cebador en presencia de 1/244 ARN DI de gripe. (a) Análisis de los niveles de ARN transcrito del segmento 6 del genoma en ausencia o presencia de una cantidad creciente de 1/244 ARN DI. En (b) se muestra la cuantificación de los niveles de ARN vírico de tres experimentos independientes mediante análisis de fosfoimagen. Los valores de las intensidades de las bandas se normalizaron frente al ARNr 5S relevante y se expresan como un porcentaje del valor máximo para cada ARN analizado. Los niveles basales de ARNV generados a partir del plásmido diana se restaron del total. Las barras de error representan el error estándar de la media de 3 experimentos independientes. ARNV (■), ARNm (▲) y ARNc (▼).

FIGURA 6. El efecto de la gripe 1/244 ARN DI en el nivel de ARN transcrito de los segmentos 2 y 3 del genoma de la gripe. El análisis del ARN derivado del segmento 2 (panel a) y del segmento 3 (panel c) en presencia de cantidades crecientes de 1/244 ARN DI se llevó a cabo como se describe en la Figura 4. En (b) y (d) se muestra la cuantificación de los niveles de ARN vírico de dos experimentos independientes. Las barras de error representan el intervalo de datos para dos experimentos. ARNV (■), ARNm (▲) y ARNc (▼).

FIGURA 7. El efecto de 1/244 ARN DI en sus propios niveles de ARN en presencia o ausencia del segmento 1-GFP. El análisis de los niveles de ARN transcrito a partir de 1/244 ARN DI en presencia de 1,0 µg de segmento 1-GFP (a) o en ausencia de cualquier otro ARN genómico (c) se llevó a cabo como se describe para la Figura 4. La banda tenue indicada por (*) es el producto de extensión del plásmido de expresión pcDNA PB2 usado en la transfección. La cuantificación de los niveles de ARN vírico de tres experimentos independientes o el intervalo de dos réplicas para transfecciones sin plásmido segmento 1-GFP añadido se muestra en (b) y (d). Las barras de error representan el error estándar de la media (b) o el intervalo (d). ARNV (■), ARN de sentido positivo (ARNc + ARNm) (▲).

FIGURA 8. Esquema de la inhibición específica de la síntesis de ARN efectuada por los segmentos 1, 2 o 3 de longitud completa por ARN de gripe de interferencia defectuosos derivados de los segmentos 1, 2 o 3. La síntesis de ARN llevada a cabo por el segmento de longitud completa 4 (no mostrado) o 6 no fue inhibida. Los recuadros sólidos en los ARN DI 1, 2 y 3 representan el elemento de interacción común, y los recuadros abiertos en los segmentos completos 1, 2 y 3 representan su contraparte. Este último está ausente del ARN 6 de longitud completa.

FIGURA 9. (a) Diagrama que muestra la relación del segmento 1 de ARN del genoma de la gripe y el segmento 1 de 244 ARN DI. Los números indican las posiciones de los nucleótidos en función de la secuencia del segmento 1 del genoma PR8 de la gripe de sentido positivo. Se muestran las posiciones de nucleótidos de los puntos de ruptura en el genoma de ARN DI. Los números debajo de los ARN indican las posiciones de nucleótidos del primer nucleótido de los codones de iniciación y terminación para los aminoácidos codificados por el ARNm transcrito a partir del segmento 1 y 244 ARN DI de longitud completa. El sombreado gris indica la secuencia codificante de PB2 y el sombreado negro indica un nuevo marco de lectura al que se accede después del punto de interrupción en 244 ARN DI. (b) Secuencia de 244 ARN DI en el sentido del ARNc que indica el marco de lectura abierto y la secuencia de proteína predicha en código de aminoácidos de una sola letra. El dominio de unión a PB1 de 35 restos de PB2 se indica con el recuadro gris oscuro y el dominio de interacción mitocondrial de 22 restos de PB2 se indica con el recuadro gris claro. La secuencia de aminoácidos encuadrada apareció *de novo* en dirección 3' de la delección central que dio lugar a 244 ARN DI. Esta secuencia no surgió del ORF de PB2. Las tres mutaciones G→C en las posiciones de nucleótidos 30, 60 y 111 usadas para mutar los codones de iniciación AUG en el marco se muestran en negrita y subrayados.

FIGURA 10. A. Transferencia Northern de ARN extraído de células infectadas con el virus 244 DI para detectar ARN de gripe de sentido positivo transcrito del segmento 1 del genoma. El carril 1 contiene ARN celular total. El carril 2 contiene ARN no poliadenilado. El carril 3 contiene ARNm poliadenilado. Se indican las posiciones de los marcadores de tamaño (nt). B. ARN víricos sintetizados por 244 AUG de inactivación génica ARN DI y 244 ARN DI. 48 h después de la transfección de plásmidos, el ARN se extrajo de las células con Trizol y se llevó a cabo un análisis de extensión del cebador. Los productos de transcripción se resolvieron en un gel de poli(acrilamida) al 6 % (p/v) que contenía urea 7 M en tampón TBE y se detectaron mediante imágenes de fósforo. El carril 1 muestra una escalera de tamaño de 100 nt, el carril 2 muestra el ARN producido en presencia de 244 ARN DI y el carril 3 muestra el ARN producido en presencia de 244 AUG de inactivación génica de ARN DI. Se indican las posiciones de ARNv y ARNm. Se usó ARN ribosómico 5S como control para confirmar que se usaron cantidades similares de ARN total.

FIGURA 11. Ensayo para la actividad de interferencia de 244 AUG de inactivación génica de ARN DI y 244 ARN DI basado en la inhibición de la expresión de fluorescencia por un segmento 1 de ARN de la gripe que expresa GFP. (a) Las células 293T se transfectaron con plásmidos que expresan el segmento 1-GFP ARN, plásmidos que expresan proteínas PB1, PB2, PA y NP y cantidades crecientes de plásmidos que expresan 244 AUG de inactivación génica ARN DI o ARN DI 244. Se examinó la fluorescencia de las células 2 días después de la transfección. (a) Las imágenes de la monocapa celular se registraron mediante microscopía de contraste de fase (izquierda de cada columna) y microscopía de epifluorescencia (derecha). La cantidad de plásmido que expresa el ARN DI se muestra a la izquierda. Las células control (arriba) se transfectaron con un vector DI vacío (1 µg). (b) Cuantificación de la fluorescencia generada en células en presencia de plásmidos transfectados que expresan el 244 AUG de atenuación génica ARN DI (gris) y 244 ARN DI de tipo silvestre (ts) parental (blanco). Se muestra el intervalo de dos experimentos independientes.

FIGURA 12. Protección de ratones frente a la gripe mediante tratamiento con virus 244 AUG de inactivación génica DI o virus 244 DI (1 µg cada uno). Los ratones se inocularon por vía intranasal con A/WSN solo (10 LD₅₀, 1000 uff), A/WSN + virus 244 AUG de atenuación génica DI, A/WSN + virus 244 DI, A/WSN + virus 244 AUG de atenuación génica DI inactivado, A/WSN + virus 244 DI inactivado o solución salina sola (paneles a, b). Tres semanas después de la infección, los ratones se provocaron con una dosis alta de A/WSN (10.000 LD₅₀) para determinar su estado inmunitario (paneles c, d). Paneles (a), (c), puntuación clínica media; paneles (b), (d), cambio en el peso medio. En (a) 244 DI + A/WSN, solo atenuación génica DI, solo 244 DI y simulado están todos ocultos bajo atenuación génica DI + A/WSN con una puntuación clínica de 1.

Descripción detallada

La invención ha identificado que la eficacia de un virus de la gripe A DI para interferir con la replicación del virus puede atribuirse a la capacidad del ARN del virus DI para interferir con la producción de ARN de cada uno de los segmentos 1, 2 y 3 del virus de la gripe A. En consecuencia, la presente divulgación proporciona métodos para identificar virus DI que son eficaces como agentes antivíricos. Por lo tanto, la presente divulgación proporciona un método para identificar un agente antivírico mediante la determinación de si el ARN de gripe defectuoso de interferencia puede interferir con la producción de ARN de cada uno de los segmentos 1, 2 y 3 del virus de gripe A. Se identifica un ARN de virus de la gripe de interferencia defectuoso que es capaz de interferir con la producción de ARN de cada uno de los segmentos 1, 2 y 3 para su incorporación en un agente antivírico.

Los métodos de la presente divulgación pueden realizarse usando cualquier formato adecuado para el ensayo que permita el análisis de la producción de ARN de cada uno de los segmentos 1, 2 y 3 del virus de la gripe A. De acuerdo con los métodos de la presente divulgación, los ensayos pueden realizarse en un solo ensayo para controlar la producción de ARN de cada uno de los segmentos 1, 2 y 3. Alternativamente, pueden realizarse múltiples ensayos para controlar la producción de ARN de cada uno de los segmentos 1, 2 y 3 por separado o en cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, los ensayos pueden comprender un primer ensayo para monitorizar la producción de ARN de los segmentos 1 y 2 con un ensayo separado que se lleva a cabo para monitorizar la producción de ARN del segmento 3. De forma similar, la producción de ARN de los segmentos 2 y 3 puede ensayarse juntos, ensayándose la producción de ARN del segmento 1 por separado, o la producción de ARN de los segmentos 1 y 3 puede ensayarse juntos, ensayándose por separado la producción de ARN del segmento 2. Normalmente, una célula se transfecta con

uno o más plásmidos que expresan ARNV de los segmentos a analizar, por ejemplo, usando plásmidos que expresan ARNV de los segmentos 1, 2 y 3.

Los ensayos se llevan a cabo en presencia de la maquinaria vírica y/o de la célula hospedadora relevante para permitir la producción de ARN de los segmentos 1, 2 y 3. Normalmente, los métodos de la presente divulgación se llevan a cabo usando una célula hospedadora. La célula hospedadora recibe los componentes necesarios para permitir la síntesis de ARN vírico. Normalmente, esto puede lograrse mediante la transfección de la célula con vectores o plásmidos adecuados que expresen las proteínas de la polimerasa de gripe A y la nucleoproteína del virus y, en particular, las proteínas PB1, PB2, PA y NP de la gripe A. Como se describió anteriormente, la célula normalmente se transfecta con plásmidos adicionales que expresan ARNV de los segmentos 1, 2 y 3.

Cuando las proteínas estructurales de la gripe A no estén codificadas o proporcionadas, no se producirán partículas de virus. Sin embargo, los niveles de producción de ARN a partir de los segmentos pueden controlarse fácilmente. Esto puede realizarse a través de la detección directa de ARNV, ARNC o ARNM asociado a cada segmento. Alternativamente, pueden proporcionarse construcciones indicadoras, por ejemplo, puede proporcionarse un ARN diana de sentido negativo codificante tal como una construcción de gen indicador de segmento, codificando un indicador tal como la proteína verde fluorescente. Cuando los segmentos 1, 2 y 3 se evalúan en combinación de tal manera que dos o más segmentos se monitorizan al mismo tiempo y se usan genes indicadores, preferentemente, se usan diferentes genes indicadores para cada segmento. Cuando se usan genes indicadores, los ensayos comprenden monitorizar la expresión del gen indicador. Una reducción en la expresión del gen indicador, por ejemplo, demostrada por una reducción en la fluorescencia, indica que se ha reducido la producción de ARN a partir de la construcción del indicador de segmento.

El ARN de virus de interferencia defectuoso para el análisis en los ensayos de la presente divulgación es normalmente ARN de virus de interferencia defectuoso derivado de la gripe A. Normalmente, el ARN del virus DI deriva del segmento 1, 2 o 3 de la gripe A. En un aspecto de la presente divulgación, El ARN del virus DI se introduce en las células, por ejemplo, proporcionando un vector o plásmido que codifica el ARN del virus DI. En un aspecto alternativo, el ensayo puede realizarse infectando las células con partículas de virus DI. En aspectos preferidos de la presente divulgación, los virus DI ensayados de acuerdo con la presente divulgación son virus DI clonados. Alternativamente, el método puede usarse para ensayar una población heterogénea de virus DI, para identificar grupo o grupos que contengan virus DI de interés, para su posterior clonación y análisis.

Las referencias a la inhibición generalmente se refieren a una reducción de al menos el 10 % en la producción de ARN vírico, ARNC o ARNM de cada segmento, normalmente al menos el 20 %, el 30 %, el 40 % o el 50 % de reducción en la producción de ARN vírico, ARNC o ARNM, preferentemente al menos el 60 %, el 70 %, el 80 % o el 90 %, preferentemente al menos el 95 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de reducción en la producción de ARN vírico, ARNC o ARNM. El ARN de virus de interferencia defectuoso que muestra los niveles más altos de inhibición de la síntesis vírica se usa lo más preferentemente como agentes antivíricos.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un virus de interferencia defectuoso para su uso como un agente antivírico. Los ARN de virus de interferencia defectuosos de la presente invención derivan de la gripe A. El ARN de gripe A de interferencia defectuoso puede derivar del segmento 1, 2 o 3. SEQ ID NO: 2, 3 y 4 establecen las secuencias del segmento 1 del virus de gripe A para las cepas A/Puerto Rico/8/34(H1N1), A/Nueva York/463/2005(H3N2) y A/Países Bajos/178/1995(H3N2) respectivamente. SEQ ID NO 5, 6 y 7 representan el segmento 2 del virus de gripe A de A/Puerto Rico/8/34(H1N1), A/Nueva York/463/2005(H3N2) y A/Países Bajos/178/1995(H3N2) respectivamente. SEQ ID NO: 8, 9 y 10 representan secuencias del segmento 3 del virus de gripe A de A/Puerto Rico/8/34(H1N1), A/Nueva York/463/2005(H3N2) y A/Países Bajos/178/1995(H3N2) respectivamente. En todos los casos, estas secuencias se presentan en el sentido positivo (antigenoma) de 5' a 3'. Las secuencias también se representan como ADN.

Las secuencias de oligonucleótido de SEQ ID NO: 2 a 10 proporcionan secuencias representativas para los segmentos 1, 2 y 3 que pueden usarse para producir el ARN DI de acuerdo con la presente invención. Las supresiones se introducen en los segmentos como se describe con más detalle anteriormente. Existe un alto grado de identidad de secuencia entre los segmentos de cada cepa. Los segmentos 1, 2 o 3 de cualquier cepa de gripe A pueden usarse para diseñar y producir un virus DI. El segmento 1 para su uso de acuerdo con la presente invención para producir un virus DI puede tener una secuencia variante que tenga al menos el 80 %, el 85 %, el 90 % o el 95 % de homología con SEQ ID NO: 2, 3 o 4 en función de la identidad de nucleótidos en toda la secuencia. Un segmento 2 para su uso de acuerdo con la presente invención para producir un virus DI puede tener al menos el 80 %, el 85 %, el 90 % o el 95 % de homología con SEQ ID NO: 5, 6 o 7 en función de la identidad de nucleótidos en toda la secuencia. Un segmento 3 para su uso de acuerdo con la presente invención para producir un virus DI puede tener al menos el 80 %, el 85 %, el 90 % o el 95 % de homología con SEQ ID NO: 8, 9 o 10 en función de la identidad de nucleótidos en toda la secuencia.

Pueden usarse métodos convencionales en la técnica para determinar la homología. Por ejemplo, el paquete UWGCG proporciona el programa BESTFIT que puede usarse para calcular la homología, por ejemplo, usado en su configuración predeterminada (Devereux *et al.* (1984) *Nucleic Acids Research* 12, p387-395). Los algoritmos PILEUP

y BLAST pueden usarse para calcular la homología o alinear secuencias (tal como identificar restos equivalentes o secuencias correspondientes (normalmente en su configuración por defecto)), por ejemplo, como se describe en Altschul S. F. (1993) J Mol Evol 36:290-300; Altschul, S.F *et al.* (1990) J Mol Biol 215: 403-10.

5 El programa informático para realizar análisis BLAST está públicamente disponible a través del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica identificar primero un par de secuencias de alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta que coinciden o satisfacen alguna puntuación de umbral de valor positivo T cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se refiere al umbral de la puntuación de palabra adyacente (Altschul *et al.*, anteriormente citado). Estos aciertos de palabra adyacente iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP que los contengan. Los aciertos de palabra se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia hasta donde pueda aumentarse la puntuación de alineación acumulativa. Las extensiones de los aciertos de palabra en cada dirección se detienen cuando: la puntuación de alineación acumulativa queda fuera por la cantidad X de su valor máximo alcanzado; la puntuación acumulativa llega a cero o menos, debido a la acumulación de una o más alineaciones de restos con puntuación negativa; o se alcanza el final de una de las secuencias. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLAST usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919) alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=4 y una comparación de ambas cadenas.

20 El algoritmo BLAST realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias; véase, por ejemplo, Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5787. Una medida de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la que sucedería una coincidencia entre dos secuencias de aminoácidos por casualidad. Por ejemplo, una secuencia se considera similar a otra secuencia si la probabilidad de suma más pequeña en comparación de la primera secuencia con la segunda secuencia es menos de aproximadamente 1, preferentemente menos de aproximadamente 0,1, más preferentemente menos de aproximadamente 0,01 y lo más preferentemente menos de aproximadamente 0,001.

30 El ARN del virus de la gripe de interferencia defectuoso comprende secuencias del segmento 1, 2 o 3 que comprenden al menos una parte de la región 5' y una parte de la región 3' del segmento y que tiene una o más deleciones en la parte central del segmento. Las secuencias en el extremo 5' y el extremo 3' del segmento están preferentemente intactas, es decir, representan secuencias contiguas desde los extremos 5' y 3' del segmento. Las regiones del extremo 5' y el extremo 3' se seleccionan para retener las señales que actúan en cis requeridas para la replicación y el empaquetamiento en partículas de virus. Normalmente, el ARN del virus de interferencia defectuoso incluirá al menos 35 100 nucleótidos hasta 500 nucleótidos de longitud desde el extremo 5' del segmento, preferentemente hasta 400 nucleótidos de longitud, preferentemente hasta 300 nucleótidos de longitud, preferentemente hasta 250 nucleótidos de longitud, tal como entre 100 y 250 nucleótidos de longitud, de 100 a 220 nucleótidos de longitud o de 120 a 220 nucleótidos de longitud, digamos de 150 a 220 nucleótidos de longitud desde el extremo 5' del segmento.

40 De forma similar, normalmente el ARN del virus de interferencia defectuoso comprende el extremo 3' del segmento que comprende una secuencia contigua desde el extremo 3', que comprende normalmente al menos 100 nucleótidos hasta 500 nucleótidos del extremo 3' del segmento, preferentemente 150 nucleótidos hasta 400 nucleótidos, tales como 150 nucleótidos hasta 280 nucleótidos del extremo 3' del segmento. La supresión comprende la supresión de una parte central del segmento, normalmente hasta 2.000 nucleótidos de longitud, normalmente al menos 45 1.000 nucleótidos de longitud, al menos 1.500 nucleótidos de longitud, 1.800 nucleótidos de longitud, 2.000 nucleótidos de longitud.

Por lo tanto, el ARN de virus de interferencia defectuoso de acuerdo con la presente invención tiene normalmente una longitud total de entre 300 nucleótidos y 600 nucleótidos, normalmente 300 nucleótidos hasta 500 nucleótidos, 50 preferentemente entre 380 nucleótidos hasta 480 nucleótidos de longitud.

Los virus de interferencia defectuosos de acuerdo con la presente invención se caracterizan por su capacidad para interferir con la producción de ARN de los segmentos 1, 2 y 3 del virus de la gripe A. Los ensayos de la actividad del virus pueden realizarse de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento.

55 Normalmente, el ARN del virus de interferencia defectuoso para su incorporación en la partícula de virus se produce por medios recombinantes. Pueden usarse técnicas recombinantes convencionales para introducir deleciones en los segmentos 1, 2 o 3 del ARN.

60 Alternativamente, el virus de interferencia defectuoso de la presente solicitud pueden ser virus clonados o recombinantes, por ejemplo, para proporcionar una preparación clonada o recombinante basada en un virus de interferencia defectuoso de origen natural. Por ejemplo, pueden tomarse muestras de individuos infectados, animales o identificar células por la presencia de partículas de virus defectuosas de interferencia. Dichos virus DI pueden examinarse para identificar la presencia de virus de interferencia defectuosos que inhiben la replicación vírica de cada uno de los segmentos 1, 2 y 3. El ARN DI de los virus después se aísla y se clona mediante técnicas recombinantes para proporcionar una preparación clonada de virus de interferencia defectuosos que tiene las características que 65

ahora se reivindican.

El ARN del virus DI como se describe en el presente documento puede incorporarse en una partícula vírica para producir un virus DI para su uso como un agente antivírico. Dichas partículas de virus pueden producirse mediante la transfección de una célula con un plásmido o vector que expresa el ARN del virus DI y plásmidos o vectores que en combinación expresan los segmentos de ARN 1 a 8 de una gripe A. La expresión de ARN y proteína puede usarse para generar partículas víricas que comprenden el ARN del virus DI. Los métodos para generar virus de gripe DI clonados se describen, por ejemplo, en el documento WO2007/135420.

De acuerdo con un aspecto preferido de la presente invención, el virus DI de la presente solicitud no es 1/244.

Un virus DI identificado como agente antivírico o un virus DI de acuerdo con la presente invención puede usarse en un método para tratar una infección vírica en un sujeto y, en particular, para tratar la infección por gripe A en un sujeto. En este documento se desvela un método para prevenir o tratar la infección por gripe A en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un virus DI identificado de acuerdo con la divulgación, o un virus DI de la invención como se describe anteriormente.

La divulgación también proporciona un virus DI identificado de acuerdo con la divulgación, o de la invención, para su uso en un método para prevenir o tratar la infección por gripe A. La divulgación proporciona además el uso de un virus DI identificado de acuerdo con la divulgación, o de la invención, en la fabricación de un medicamento para prevenir o tratar la infección por gripe A.

Los virus DI derivados de la gripe A también han demostrado ser eficaces en el tratamiento de infecciones víricas provocadas por otros virus, en particular, infecciones por virus respiratorios. Por lo tanto, un virus DI de acuerdo con la presente invención también puede usarse para el tratamiento de otras infecciones por virus respiratorios, incluyendo infecciones víricas causadas por virus de los paramixoviridae, tales como pneumovirus o metapneumovirus y virus provocados por virus de los orthomyoviridae. Los ejemplos de virus respiratorios que pueden tratarse de acuerdo con la presente invención incluyen el virus sincicial respiratorio humano, el metapneumovirus humano, el virus de la gripe B o de la gripe C.

Normalmente, el individuo es un ser humano. El sujeto es normalmente un paciente, pero también puede ser un individuo en riesgo de infección.

El virus DI de la invención puede usarse para tratar la infección por gripe A. En el caso de tratar, el sujeto tiene normalmente una infección por gripe A, es decir, se le ha diagnosticado una infección por gripe A, o se sospecha que tiene una infección por gripe A, es decir, muestra los síntomas de una infección por gripe A. El individuo también puede estar en riesgo de infección, y el virus DI se usa de forma profiláctica para prevenir o tratar la infección mediante la administración hasta 2 semanas, normalmente hasta 1 semana antes de la exposición a la gripe A. El sujeto es normalmente sintomático pero también puede ser asintomático. Como se usa en el presente documento, el término "tratar" incluye cualquiera de los siguientes: la prevención de una infección de gripe A o de uno o más síntomas asociados con una infección de gripe A; una reducción o prevención del desarrollo o progresión de la infección o los síntomas de gripe A; y la reducción o eliminación de una infección o síntomas de gripe A existentes.

La terapia y la prevención incluyen, por ejemplo, aliviar, reducir, curar o al menos detener parcialmente los síntomas y/o complicaciones resultantes o asociadas a una infección de gripe A. Cuando se proporciona terapéuticamente, la terapia se proporciona normalmente en o poco después del inicio de un síntoma de una infección de la gripe A. Una administración terapéutica tal es normalmente para prevenir o mejorar la progresión de, o un síntoma de la infección, o para reducir la gravedad de un síntoma o infección tales. Cuando se proporcionan de manera profiláctica, el tratamiento generalmente se proporciona antes del inicio de un síntoma de una infección por gripe A. Una administración profiláctica tal es normalmente para prevenir la aparición de los síntomas de la infección. Los virus DI identificados de acuerdo con la presente divulgación o de la presente invención pueden administrarse para tratar o prevenir infecciones, antes de que una persona se infecte, pero cuando se sospecha o es probable que el individuo entre en contacto con el virus de la gripe A. Por ejemplo, el virus DI de la presente invención se puede administrar 1 día, 3 días, 1 semana o hasta 2 semanas antes de la exposición a la gripe A.

Las vías, las dosificaciones y los métodos de administración específicos del virus DI identificados de acuerdo con la divulgación o de la invención pueden determinarse de forma rutinaria por el médico facultativo. Estos se analizan con más detalle a continuación. Normalmente, se administra al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz o profilácticamente eficaz del virus DI de la invención. Una cantidad profilácticamente eficaz es una cantidad que previene la infección por gripe A y/o la aparición de uno o más síntomas de la infección por gripe A. Una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad eficaz para mejorar uno o más síntomas de la infección por gripe A. Una cantidad terapéuticamente eficaz suprime preferentemente uno o más síntomas de la enfermedad. Normalmente, una cantidad tal reduce la infección por gripe A o el título vírico en el sujeto.

El virus DI de la invención puede usarse en combinación con una o más terapias destinadas a tratar al mismo sujeto. Por combinación se entiende que las terapias pueden administrarse simultáneamente, en una forma combinada o

separada, a un sujeto. Las terapias pueden administrarse por separado o secuencialmente a un sujeto como parte del mismo régimen terapéutico o profiláctico. Por ejemplo, el virus DI de la invención puede usarse en combinación con otra terapia destinada a inhibir la infección por gripe A o manejar un síntoma de la misma. La otra terapia puede ser una terapia general destinada a tratar o mejorar la condición de un sujeto con una infección de gripe A.

5 El virus DI identificado de acuerdo con la divulgación o la invención puede administrarse al sujeto por cualquier medio adecuado. Normalmente el virus DI se administra a las vías respiratorias, normalmente por administración intranasal o intrabucal, inhalación o instilación.

10 El virus DI de la invención puede formularse en composiciones farmacéuticas. Estas composiciones pueden comprender, además de uno de los virus DI anteriores, un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones también pueden comprender otros excipientes, tampones, estabilizantes u otros materiales bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Dichos materiales no deben ser tóxicos y no deben interferir con la eficacia del virus DI. La naturaleza precisa del vehículo o diluyente puede depender de la vía de administración, por
15 ejemplo, vías oral, intravenosa, cutánea o subcutánea, nasal, intramuscular, intraperitoneal.

Las formulaciones orales incluyen dichos excipientes normalmente empleados como, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio y similares. Estas composiciones adoptan la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, pastillas, cápsulas,
20 formulaciones de liberación sostenida o polvos y contienen del 10 % al 95 % de principio activo, preferentemente del 25 % al 70 %. Cuando la composición farmacéutica está liofilizada, el material liofilizado puede reconstituirse antes de su administración, por ejemplo, una suspensión. La reconstitución se efectúa preferentemente en agua. Normalmente las formulaciones son adecuadas para la administración intranasal y pueden proporcionarse en forma de pulverizador nasal, gotas nasales, gel o polvo.

25 Se administra una cantidad eficaz, tal como una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz, del virus DI. La dosis puede determinarse de acuerdo con diversos parámetros, especialmente de acuerdo con el virus DI usado; la edad, el peso y la condición del sujeto que se va a tratar; la vía de administración; y el régimen requerido. De nuevo, un médico será capaz de determinar la vía de administración y dosificación necesarias para cualquier sujeto particular.

30 En otro aspecto de la presente divulgación, se proporciona un virus DI en donde el ARN del virus DI no es capaz de producir una proteína. Normalmente, esto se logra mediante la mutación del ARN del virus DI para retirar las secuencias de señalización requeridas para la expresión de proteínas. En un aspecto de la presente divulgación, esto se hace por delección o sustitución de uno o más codones de iniciación AUG. Por ejemplo, el codón de iniciación puede
35 estar mutado en una o más posiciones. En un aspecto, los presentes inventores describen la mutación de uno o más codones de iniciación a AUC y normalmente todos los codones de iniciación están mutados a AUC.

El ARN del virus DI de la divulgación puede ser un virus DI conocido. En un aspecto preferido de la presente divulgación, el ARN del virus DI es 1/244 que incorpora una mutación de los codones de iniciación AUG. El virus DI
40 puede incluir una o más mutaciones para mutar uno, más de uno o todos los codones de iniciación AUG en el virus DI. En el caso de 244 ARN DI, se introducen mutaciones en los codones de iniciación AUG presentes en las posiciones 28 a 30, 58 a 60 y 109 a 111. Las mutaciones adecuadas incluyen la mutación de G a C, por ejemplo, en las posiciones 30, 60 y 111 de 244 ARN DI.

45 Pueden incorporarse mutaciones similares en otro ARN DI, particularmente, ARN DI derivado del virus de la gripe A. Dicho ARN DI puede aquel como se describe anteriormente. En particular, el ARN de gripe A de interferencia defectuoso puede derivar del segmento 1, 2 o 3. SEQ ID NO: 2, 3 y 4 establecen las secuencias del segmento 1 del virus de gripe A para las cepas A/Puerto Rico/8/34(H1N1), A/Nueva York/463/2005(H3N2) y A/Países Bajos/178/1995(H3N2) respectivamente. SEQ ID NO 5, 6 y 7 representan el segmento 2 del virus de gripe A de
50 A/Puerto Rico/8/34(H1N1), A/Nueva York/463/2005(H3N2) y A/Países Bajos/178/1995(H3N2) respectivamente. SEQ ID NO: 8, 9 y 10 representan secuencias del segmento 3 del virus de gripe A de A/Puerto Rico/8/34(H1N1), A/Nueva York/463/2005(H3N2) y A/Países Bajos/178/1995(H3N2) respectivamente. En todos los casos, estas secuencias se presentan en el sentido positivo (antigenoma) de 5' a 3'. Las secuencias también se representan como ADN.

55 Las secuencias de oligonucleótido de SEQ ID NO: 2 a 10 proporcionan secuencias representativas para los segmentos 1, 2 y 3 que pueden usarse para producir el ARN DI de acuerdo con este aspecto de la presente divulgación. Las supresiones se introducen en los segmentos como se describe con más detalle anteriormente. Existe un alto grado de identidad de secuencia entre los segmentos de cada cepa. Los segmentos 1, 2 o 3 de cualquier cepa de gripe A pueden usarse para diseñar y producir un virus DI. El segmento 1 para su uso de acuerdo con este aspecto de la
60 presente divulgación para producir un virus DI puede tener una secuencia variante que tenga al menos el 80 %, el 85 %, el 90 % o el 95 % de homología con SEQ ID NO: 2, 3 o 4 en función de la identidad de nucleótidos en toda la secuencia. Un segmento 2 para su uso de acuerdo con este aspecto de la presente divulgación para producir un virus DI puede tener al menos el 80 %, el 85 %, el 90 % o el 95 % de homología con SEQ ID NO: 5, 6 o 7 en función de la identidad de nucleótidos en toda la secuencia. Un segmento 3 para su uso de acuerdo con este aspecto de la presente
65 divulgación para producir un virus DI puede tener al menos el 80 %, el 85 %, el 90 % o el 95 % de homología con SEQ ID NO: 8, 9 o 10 en función de la identidad de nucleótidos en toda la secuencia.

Pueden usarse métodos convencionales en la técnica para determinar la homología. Por ejemplo, el paquete UWGCG proporciona el programa BESTFIT que puede usarse para calcular la homología, por ejemplo, usado en su configuración predeterminada (Devereux *et al.* (1984) *Nucleic Acids Research* 12, p387-395). Los algoritmos PILEUP y BLAST pueden usarse para calcular la homología o alinear secuencias (tal como identificar restos equivalentes o secuencias correspondientes (normalmente en su configuración por defecto)), por ejemplo, como se describe en Altschul S. F. (1993) *J Mol Evol* 36:290-300; Altschul, S.F *et al.* (1990) *J Mol Biol* 215: 403-10.

El programa informático para realizar análisis BLAST está públicamente disponible a través del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica identificar primero un par de secuencias de alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta que coinciden o satisfacen alguna puntuación de umbral de valor positivo T cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se refiere al umbral de la puntuación de palabra adyacente (Altschul *et al.*, anteriormente citado). Estos aciertos de palabra adyacente iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP que los contengan. Los aciertos de palabra se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia hasta donde pueda aumentarse la puntuación de alineación acumulativa. Las extensiones de los aciertos de palabra en cada dirección se detienen cuando: la puntuación de alineación acumulativa queda fuera por la cantidad X de su valor máximo alcanzado; la puntuación acumulativa llega a cero o menos, debido a la acumulación de una o más alineaciones de restos con puntuación negativa; o se alcanza el final de una de las secuencias. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLAST usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915-10919) alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=4 y una comparación de ambas cadenas.

El algoritmo BLAST realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias; véase, por ejemplo, Karlin y Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5873-5787. Una medida de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la que sucedería una coincidencia entre dos secuencias de aminoácidos por casualidad. Por ejemplo, una secuencia se considera similar a otra secuencia si la probabilidad de suma más pequeña en comparación de la primera secuencia con la segunda secuencia es menos de aproximadamente 1, preferentemente menos de aproximadamente 0,1, más preferentemente menos de aproximadamente 0,01 y lo más preferentemente menos de aproximadamente 0,001.

El ARN del virus de la gripe de interferencia defectuoso comprende secuencias del segmento 1, 2 o 3 que comprenden al menos una parte de la región 5' y una parte de la región 3' del segmento y que tiene una o más delecciones en la parte central del segmento. Las secuencias en el extremo 5' y el extremo 3' del segmento están preferentemente intactas, es decir, representan secuencias contiguas desde los extremos 5' y 3' del segmento. Las regiones del extremo 5' y el extremo 3' se seleccionan para retener las señales que actúan en *cis* requeridas para la replicación y el empaquetamiento en partículas de virus. Normalmente, el ARN del virus de interferencia defectuoso incluirá al menos 100 nucleótidos hasta 500 nucleótidos de longitud desde el extremo 5' del segmento, preferentemente hasta 400 nucleótidos de longitud, preferentemente hasta 300 nucleótidos de longitud, preferentemente hasta 250 nucleótidos de longitud, tal como entre 100 y 250 nucleótidos de longitud, de 100 a 220 nucleótidos de longitud o de 120 a 220 nucleótidos de longitud, digamos de 150 a 220 nucleótidos de longitud desde el extremo 5' del segmento.

De forma similar, normalmente el ARN del virus de interferencia defectuoso comprende el extremo 3' del segmento que comprende una secuencia contigua desde el extremo 3', que comprende normalmente al menos 100 nucleótidos hasta 500 nucleótidos del extremo 3' del segmento, preferentemente 150 nucleótidos hasta 400 nucleótidos, tales como 150 nucleótidos hasta 280 nucleótidos del extremo 3' del segmento. La supresión comprende la supresión de una parte central del segmento, normalmente hasta 2.000 nucleótidos de longitud, normalmente al menos 1.000 nucleótidos de longitud, al menos 1.500 nucleótidos de longitud, 1.800 nucleótidos de longitud, 2.000 nucleótidos de longitud.

Por lo tanto, el ARN de virus de interferencia defectuoso de acuerdo con este aspecto de la presente divulgación tiene normalmente una longitud total de entre 300 nucleótidos y 600 nucleótidos, normalmente 300 nucleótidos hasta 500 nucleótidos, preferentemente entre 380 nucleótidos hasta 480 nucleótidos de longitud.

Normalmente, el ARN del virus de interferencia defectuoso para su incorporación en la partícula de virus se produce por medios recombinantes. Pueden usarse técnicas recombinantes convencionales para introducir delecciones en los segmentos 1, 2 o 3 del ARN, junto con mutaciones adicionales en uno o más de los codones de iniciación como se describe anteriormente.

El ARN del virus DI como se describe en el presente documento puede incorporarse en una partícula vírica para producir un virus DI para su uso como un agente antivírico. Dichas partículas de virus pueden producirse mediante la transfección de una célula con un plásmido o vector que expresa el ARN del virus DI y plásmidos o vectores que en combinación expresan los segmentos de ARN 1 a 8 de una gripe A. La expresión de ARN y proteína puede usarse para generar partículas víricas que comprenden el ARN del virus DI.

Un virus DI de acuerdo con este aspecto de la presente divulgación puede usarse en un método para tratar una infección vírica en un sujeto, por ejemplo, para tratar la infección por gripe A en un sujeto. En este documento se desvela un método para prevenir o tratar la infección por gripe A en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un virus DI de este aspecto de la divulgación como se describe en el presente documento. El virus DI de acuerdo con este aspecto de la divulgación también puede usarse para tratar otras infecciones víricas.

La divulgación también proporciona un virus DI de este aspecto de la divulgación para su uso en un método para prevenir o tratar la infección por gripe A. La divulgación proporciona además el uso de un virus DI de este aspecto de la divulgación en la fabricación de un medicamento para prevenir o tratar la infección por gripe A.

Los virus DI derivados de la gripe A también han demostrado ser eficaces en el tratamiento de infecciones víricas provocadas por otros virus, en particular, infecciones por virus respiratorios. Por lo tanto, un virus DI de acuerdo con este aspecto de la presente divulgación también puede usarse para el tratamiento de otras infecciones por virus respiratorios, incluyendo infecciones víricas causadas por virus de los paramixoviridae, tales como pneumovirus o metapneumovirus y virus provocados por virus de los orthomyoviridae. Los ejemplos de virus respiratorios que pueden tratarse de acuerdo con este aspecto de la presente divulgación incluyen el virus sincicial respiratorio humano, el metapneumovirus humano, el virus de la gripe B o de la gripe C.

Normalmente, el individuo es un ser humano. El sujeto es normalmente un paciente, pero también puede ser un individuo en riesgo de infección.

El virus DI de este aspecto de la divulgación puede usarse para tratar la infección por gripe A. En el caso de tratar, el sujeto tiene normalmente una infección por gripe A, es decir, se le ha diagnosticado una infección por gripe A, o se sospecha que tiene una infección por gripe A, es decir, muestra los síntomas de una infección por gripe A. El individuo también puede estar en riesgo de infección, y el virus DI se usa de forma profiláctica para prevenir o tratar la infección mediante la administración hasta 2 semanas, normalmente hasta 1 semana antes de la exposición a la gripe A. El sujeto es normalmente sintomático pero también puede ser asintomático. Como se usa en el presente documento, el término "tratar" incluye cualquiera de los siguientes: la prevención de una infección de gripe A o de uno o más síntomas asociados con una infección de gripe A; una reducción o prevención del desarrollo o progresión de la infección o los síntomas de gripe A; y la reducción o eliminación de una infección o síntomas de gripe A existentes.

La terapia y la prevención incluyen, por ejemplo, aliviar, reducir, curar o al menos detener parcialmente los síntomas y/o complicaciones resultantes o asociadas a una infección de gripe A. Cuando se proporciona terapéuticamente, la terapia se proporciona normalmente en o poco después del inicio de un síntoma de una infección de la gripe A. Una administración terapéutica tal es normalmente para prevenir o mejorar la progresión de, o un síntoma de la infección, o para reducir la gravedad de un síntoma o infección tales. Cuando se proporcionan de manera profiláctica, el tratamiento generalmente se proporciona antes del inicio de un síntoma de una infección por gripe A. Una administración profiláctica tal es normalmente para prevenir la aparición de los síntomas de la infección. Los virus DI identificados de acuerdo con la presente divulgación o de este aspecto de la presente divulgación pueden administrarse para tratar o prevenir infecciones, antes de que una persona se infecte, pero cuando se sospecha o es probable que el individuo entre en contacto con el virus de la gripe A. Por ejemplo, el virus DI de este aspecto de la presente divulgación puede administrarse 1 día, 3 días, 1 semana o hasta 2 semanas antes de la exposición a la gripe A.

Las vías, las dosificaciones y los métodos de administración específicos del virus DI identificados de acuerdo con la divulgación o de este aspecto de la divulgación pueden determinarse de forma rutinaria por el médico facultativo. Estos se analizan con más detalle a continuación. Normalmente, se administra al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz o profilácticamente eficaz del virus DI de este aspecto de la divulgación. Una cantidad profilácticamente eficaz es una cantidad que previene la infección por gripe A y/o la aparición de uno o más síntomas de la infección por gripe A. Una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad eficaz para mejorar uno o más síntomas de la infección por gripe A. Una cantidad terapéuticamente eficaz suprime preferentemente uno o más síntomas de la enfermedad. Normalmente, una cantidad tal reduce la infección por gripe A o el título vírico en el sujeto.

El virus DI de este aspecto de la divulgación puede usarse en combinación con una o más terapias destinadas a tratar al mismo sujeto. Por combinación se entiende que las terapias pueden administrarse simultáneamente, en una forma combinada o separada, a un sujeto. Las terapias pueden administrarse por separado o secuencialmente a un sujeto como parte del mismo régimen terapéutico o profiláctico. Por ejemplo, el virus DI de este aspecto de la divulgación puede usarse en combinación con otra terapia destinada a inhibir la infección por gripe A o manejar un síntoma de la misma. La otra terapia puede ser una terapia general destinada a tratar o mejorar la condición de un sujeto con una infección de gripe A.

El virus DI de este aspecto de la divulgación puede administrarse al sujeto por cualquier medio adecuado. Normalmente el virus DI se administra a las vías respiratorias, normalmente por administración intranasal o intrabucal, inhalación o instilación.

El virus DI de este aspecto de la divulgación puede formularse en composiciones farmacéuticas. Estas composiciones

pueden comprender, además de uno de los virus DI anteriores, un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones también pueden comprender otros excipientes, tampones, estabilizantes u otros materiales bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Dichos materiales no deben ser tóxicos y no deben interferir con la eficacia del virus DI. La naturaleza precisa del vehículo o diluyente puede depender de la vía de administración, por ejemplo, vías oral, intravenosa, cutánea o subcutánea, nasal, intramuscular, intraperitoneal.

Las formulaciones orales incluyen dichos excipientes normalmente empleados como, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio y similares. Estas composiciones adoptan la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, pastillas, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos y contienen del 10 % al 95 % de principio activo, preferentemente del 25 % al 70 %. Cuando la composición farmacéutica está liofilizada, el material liofilizado puede reconstituirse antes de su administración, por ejemplo, una suspensión. La reconstitución se efectúa preferentemente en agua. Normalmente las formulaciones son adecuadas para la administración intranasal y pueden proporcionarse en forma de pulverizador nasal, gotas nasales, gel o polvo.

Se administra una cantidad eficaz, tal como una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz, del virus DI. La dosis puede determinarse de acuerdo con diversos parámetros, especialmente de acuerdo con el virus DI usado; la edad, el peso y la condición del sujeto que se va a tratar; la vía de administración; y el régimen requerido. De nuevo, un médico será capaz de determinar la vía de administración y dosificación necesarias para cualquier sujeto particular.

Ejemplos

Ejemplo 1 - ARN DI inhibe la producción de ARN de los segmentos 1, 2 y 3

Materiales y métodos

Plásmidos

Los plásmidos que codifican los 8 segmentos génicos de la cepa A/WSN de A/WS/33 y los plásmidos que expresan las proteínas polimerasa y NP (Neumann *et al.* 1999), y el vector que expresaba 1/244 ARN DI (Figura 1) eran como se describió previamente (Duhaut y Dimmock 2002; Dimmock *et al.* 2008). El 1/244 ARN comprende 395 nt y derivó del segmento 1 de A/Puerto Rico/8/34 (H1N1). La diana del segmento 1, segmento 1-GFP, se creó amplificando el ORF de GFP mediante PCR a partir de pEGFP-N1 (Clontech) usando los cebadores 5'ATGGTCTCTACTGATGGTGAGCAAGGGCGAG y 5'ATGAAGACAATCTCTTACTTGTACAGCTCGTCCA. El producto se insertó entre los sitios *Bpil* and *Eco31I* de pPoll-220 (Duhaut y Dimmock 2000) de tal manera que el ORF de GFP está en marco con el ORF de PB2, dando el plásmido seg 1-GFP que expresa el segmento 1-GFP ARN (Figura 1). El indicador GFP conserva el extremo exacto 5' (220 nt) y 3' (48 nt) del segmento 1 y es afín a 1/244 ARN DI. Un segmento 2 DI (2/265; que comprende 452 nt en total con 265 nt del extremo 5' y 187 nt del extremo 3' del ARN afín de sentido negativo) se aisló de una preparación de virus DI A/equino/Newmarket/7339/79 (H3N8) (Figura 1) (Mann *et al.* 2006) por amplificación RT-PCR y posteriormente se clonó en un vector de expresión pPoll-SapIT (Subbarao *et al.* 2003). Un segmento 3 de ARN DI (3/262; que comprende 469 nt en total con 262 nt del extremo 5' y 207 nt del extremo 3' del ARN afín de sentido negativo) se aisló de una preparación DI A/WSN y se amplificó y se clonó como se indicó anteriormente (Figura 1). Los ARN DI codificados por los diversos plásmidos retienen las secuencias de nucleótidos exactas de los extremos de los segmentos del genoma de los virus de los que derivaron y no contienen ninguna mutación en posiciones que se sabe que tienen un efecto sobre la replicación o el empaquetamiento.

Transfección

Se transfectaron células 293T humanas como se describió anteriormente (Dimmock *et al.* 2008). Brevemente, para el análisis de transferencia Northern, un pocillo de células 293T confluentes al 70 % en una placa de 12 pocillos se transfectó usando el reactivo de transfección TransIT LT1 (Mirus) con 8 plásmidos de expresión Poll que codifican plásmidos de ADNc y ARN sentido vírico para la expresión de proteínas PB2, PB1, PA y NP, con o sin pPoll-244. Las células transfectadas se incubaron después a 37 °C durante la noche antes de cocultivar con células MDCK en un matraz de 25 cm². El ARN celular total se extrajo con 2 ml de reactivo Trizol por muestra (Invitrogen) los días 1, 2 y 3 después del cocultivo, mientras que el líquido de cultivo de tejidos se recogió para la titulación del virus y la extracción de ARN. Los viriones se purificaron por ultracentrifugación. El ARN se extrajo con fenol/cloroformo y después se precipitó con etanol. Para las transfecciones, cada pocillo de una placa de 6 pocillos que contenía las células 293T confluentes al 70 % se transfectó con 1 µg de cada uno de los plásmidos de expresión de ADNc PB2, PB1, PA y NP más diversas cantidades de un plásmido DI o pPoll-NA junto con 1 µg de plásmido diana. Después de dos días de incubación a 37 °C, se descartó el sobrenadante y se extrajo el ARN con Trizol.

Ensayo de infectividad

Se infectaron monocapas de células MDCK en placas de 96 pocillos con sobrenadante que contenía A/WSN rescatado como se describe anteriormente (Scott *et al.* 2011). Después de 1 hora para la fijación del virus, la monocapa se lavó

con PBS y se incubó en medio de mantenimiento durante la noche a 33 °C. A continuación, las células se fijaron con formaldehído al 4 % (v/v), se lavaron y se bloquearon con leche en polvo al 5 % (p/v) en PBS. Las células infectadas se sondearon con un anticuerpo monoclonal específico para la HA de A/WSN en PBS que contenía Tween 20 al 0,1 %. Después del lavado, se añadió conjugado de fosfatasa alcalina-IgG anti-ratón de cabra (Sigma) en TBS que contenía Tween 20 al 0,1 % y las células infectadas se detectaron con cloruro de azul de nitrotetrazolio/BCIP (Sigma) en cloruro de magnesio tamponado con Tris y cloruro sódico (0,1 M, pH 9,5). El título de infectividad se determinó contando al menos 50 células teñidas positivamente (focos) a una dilución apropiada en cada uno de los pocillos por triplicado. Se determinó el número medio de recuentos para dar un título en unidades formadoras de focos (u.f.f.) ml⁻¹.

Extensión del cebador

El ARN celular total se extrajo de las células con Trizol a las 48 h después de la transfección y se usó para el análisis de extensión del cebador (Rehwinkel *et al.* 2010). Dos µg de ARN total se mezclaron con cebadores marcados en el extremo 5' con [³²P] y dNTP en un volumen total de 13 µl. La mezcla se calentó a 65 °C durante 5 min y se colocó en hielo durante 1 min. Se añadieron 2x tampón de primera hebra, DTT 20 mM y 100 U de transcriptasa inversa SuperScript III (Invitrogen) y se incubaron a 55 °C durante 1 h. La reacción se terminó calentando a 95 °C durante 5 min con colorante de carga de gel II (Ambion). Los productos de transcripción se resolvieron en un gel de poliacrilamida al 6 % (p/v) que contenía urea 7 M en tampón TBE y se detectaron mediante imágenes de fósforo. Los cebadores usados se muestran en la Tabla 1 y las posiciones de estos en los diversos ARN diana se demuestran en la Figura 1.

TABLA 1. Secuencias de los cebadores usados en este estudio. Los cebadores que contenían nucleótidos mixtos se diseñaron para la detección de ARN derivados de A/PR8 y A/WSN. Los cebadores indicados con un asterisco fueron tomados de (Rehwinkel *et al.* 2010).

ARN diana	Especificidad de cebador	Secuencia de cebador
Segmento 1-GFP	ARNc/m	GGACACGCTGAACCTTGTGG
	ARNv	AGATAAGAGGATAATGGAAATG
DI 1/244	ARNc/m	ATATGGTCCACKGTGGTTTTTG
	ARNv	GGAGAAGACTGAGGGGATTC
Segmento 2 (PB1)	ARNc/m*	TCCATGGTGTATCCTGTTCC
	ARNv*	TGATTTTGAATCTGGAAGGA
Segmento 3 (PA)	ARNc/m*	TGAGTGCATATTGCTGCAAAT
	ARNv*	TTCTTATCGTTCAGGCTCTT
Segmento 6 (NA)	ARNc/m*	TCCAGTATGGTTTTGAYTTCCR
	ARNv*	TGGACTAGTGSGAGCATSAT
ARNr 5S*		TCCCAGGCGGTCTCCCATCC

Transferencia Northern

Para la electroforesis en gel de glioxalagarosa se usaron diez µg de ARN celular total o el 50 % del rendimiento de ARN de virión purificado de cada muestra. El ARN se transfirió a una membrana Hybond-N (GE Healthcare) durante la noche usando 20x SSC. La membrana se coció después a 80 °C durante 2 h y se hibridó con sondas marcadas con digoxigenina (DIG) durante la noche. Las sondas del segmento 1, del segmento 2 y del segmento 7 marcadas con DIG de sentido positivo de longitud completa se transcribieron *in vitro* en presencia de DIG-UTP (Roche) de productos de PCR que contienen un promotor T7. Para la detección se usó el sistema Roche con un fragmento de anticuerpo FAb conjugado con fosfatasa alcalina específica de digoxigenina y el sustrato CSPD quimioluminiscente. Las transferencias se expusieron a película X Fuji hasta que se alcanzó la densidad deseada y las bandas se cuantificaron mediante densitometría usando ImageJ (NIH).

Cuantificación de células que expresan GFP

Las células 293T se transfectaron con el plásmido que expresa segmento 1-GFP, plásmidos que expresan proteínas PB1, PB2, PA y NP y cantidades crecientes de un plásmido Poll adicional que expresa un ARN DI (1/244, 2/265 o 3/262) o un RNA de longitud completa (segmento 4 o 6). Dos días después de la transfección, los cultivos se examinaron para determinar la expresión de GFP. Se tomaron imágenes digitales de las monocapas celulares mediante microscopía de epifluorescencia y contraste de fase. Se seleccionaron aleatoriamente cinco imágenes de fluorescencia de campo y se analizaron para la proporción del área visualizada que expresa GFP usando el software HCLImage (Hamamatsu). La visualización detecta células que expresan un intervalo de niveles de GFP para incluir aquellas que pueden haber sido transfectadas con diferentes niveles de los plásmidos indicadores. Se calculó una media para dar el porcentaje del área positiva de GFP por monocapa.

Resultados**1/244 ARN DI interfiere con el empaquetamiento del segmento 1**

Los presentes inventores han usado un sistema de rescate de plásmidos para generar una preparación del virus de la gripe en el cual 1/244 ARN DI era el único ARN DI presente (Dimmock *et al.* 2008). La derivación de 1/244 ARN DI del segmento 1 se muestra en la Figura 1. Esto se usó para investigar el efecto de cantidades crecientes de 1/244 ADN DI de en los niveles de segmentos 1, 2 y 7 de ARNv en células infectadas y partículas de virus purificadas en los días 1-3 posteriores al cocultivo. Anteriormente se demostró que los ARNv de gripe solo son detectables cuando todos los componentes de la ARN polimerasa del virus están presentes, demostrando que los ARNv se generan por la polimerasa del virus (Duhaut y Dimmock 2002). El 1/244 ARN DI (395 nt) se observó solo en cultivos transfectados con el plásmido 1/244, confirmando que no se generaron otras secuencias de ARN DI del segmento 1 durante el experimento (Figura 2a). A medida que aumentaba la cantidad de ADN de plásmido 1/244 DI en la transfección, hubo una reducción progresiva en el nivel de ARNv del segmento 7 detectado en las células en cada uno de los tres días examinados. La reducción en el título de infectividad del virus observada con el aumento de plásmido 1/244 en cada uno de los 3 días confirmó que se estaba produciendo una interferencia mediada por 1/244 ARN DI (Figura 2b). A medida que aumentaba la entrada del plásmido 1/244 DI, el nivel de ARNv del segmento 1 dentro de las partículas de virus disminuyó drásticamente y fue indetectable cuando se transfectó 1 µg de plásmido 1/244 (Fig. 2a, panel inferior). La cuantificación mostró que en presencia de 1/244 ARN, la relación de ARNv del segmento 1: segmento 7 fueron considerablemente más bajos en los viriones que en los extractos celulares (Figura 2d). Esto estableció que 1/244 ARN DI (derivado del segmento 1) actúa, al menos en parte, mediante la exclusión selectiva del ARNv del segmento 1 de longitud completa de las partículas de virus de la progenie. El contenido de ARNv del segmento 2 de los viriones no se redujo en presencia de cantidades crecientes de plásmido 1/244 transfectado (Figura 2c, d), confirmando que la inhibición del empaquetamiento del segmento 1 por 1/244 ARN era específica y no se extendía a otros segmentos de ARN que codifican el componente de polimerasa.

Los ARN DI del segmento 1, 2 o 3 inhiben la expresión génica del segmento 1

Para separar los posibles efectos del ARN DI en la síntesis de ARN vírico del empaquetamiento del ARN, los presentes inventores idearon un ensayo de expresión de GFP en donde la transcripción y replicación de un ARN diana de sentido negativo que codifica GFP (segmento 1-GFP; Figura 1) se habilitaron por cotransfección de plásmidos que expresan proteínas PB1, PB2, PA y NP. Este sistema permite la síntesis de ARN vírico pero no la formación de partículas víricas ya que se omitieron los plásmidos que codifican proteínas estructurales clave (HA, NA, M1 y M2). Los efectos de los plásmidos codificantes de ARN DI cotransfectados se evaluaron mediante el control de la fluorescencia de GFP. En ausencia del plásmido que codifica la proteína PB2, no se detectó expresión de GFP (datos no mostrados). La Figura 3a muestra que el plásmido 1/244 DI inhibió fuertemente la fluorescencia de una manera dependiente de la dosis en comparación con un cultivo transfectado con 1 µg de vector control vacío. La inhibición fue mucho menos marcada cuando las células se transfectaron con plásmidos que sintetizaron ARNv de segmento 4 o segmento 6 de longitud completa. La cuantificación mostró que 0,1 µg de plásmido 1/244 DI inhibían la fluorescencia de GFP en un 70 %, mientras que se requirió aproximadamente 10 veces más del plásmido del segmento 6 para producir un nivel similar de inhibición (61-69 %) (Figura 3b). El análisis estadístico mostró que el efecto inhibitorio de 1/244 ARN DI fue muy significativamente diferente a los efectos del segmento 6 de ARN (Figura 3b). Por lo tanto, 1/244 ARN DI inhibe fuertemente la expresión de un ARN diana del segmento 1. Otros ensayos mostraron que un ARN DI derivado del segmento 2 (2/265) y un ARN DI derivado del segmento 3 (3/262) también inhibieron fuertemente la fluorescencia de GFP de la diana derivadas del segmento 1, mientras que un ARNv de segmento 4 de longitud completa, como el ARNv de segmento 6 solo fue débilmente inhibidor (Figura 3a). En la concentración más alta de ADN plásmido usada (1 µg), el ARNv del segmento 4 redujo la expresión génica derivada del segmento 1 al 75 % del nivel de control, mientras que 2/265 y 3/262 ARN DI redujeron la expresión al 2 % y al 6 % del control, respectivamente.

1/244 ARN DI inhibe diferencialmente la síntesis de ARN de sentido positivo del segmento genómico 1, 2 y 3 pero no del segmento 6

La expresión de GFP del plásmido Poll del segmento 1-GFP depende de la transcripción del ARNv de sentido negativo en ARNm. Sin embargo, ARNv también es plantilla para ARNc, que a su vez actúa como plantilla para la producción de más ARNv. El ARNm del virus de la gripe tiene una extensión 5' de aproximadamente 12 nt escindidos del ARNm hospedador (Palese y Shaw 2007), por lo que los productos de ARNm y ARNc pueden distinguirse por tamaño. Usando un ensayo de extensión de cebador que detecta niveles de ARNv, ARNm y ARNc, los presentes inventores identificaron la etapa de la síntesis de ARN diana con la que interfiere 1/244 ARN DI (Figura 4a, c). Los niveles basales de ARNv sintetizados directamente a partir del ADN del plásmido transfectado se restaron de los valores presentados en los datos que se muestran en los paneles b y d de la Figura 4. Tomados en conjunto, los datos en la Figura 3 y la Figura 4 muestran que la reducción en el nivel de ARNm codificado por GFP del segmento 1 en presencia de cantidades crecientes de ARN DI se correlacionó positivamente con la reducción en la fluorescencia de GFP ($R^2 = 0,90$; datos no mostrados), confirmando que la fluorescencia era un marcador fiel de la síntesis de ARNm. La cuantificación de estos datos mostró que los niveles de ARNm y ARNc se vieron considerablemente más afectados que el ARNv en presencia de 0,1 µg a 0,5 µg de 1/244 plásmido de ADN (Figura 4b). La adición de 0,1 µg de ADN de plásmido 1/244 redujo los niveles de ARNm y ARNc al 13 % y al 10 % del control, respectivamente, mientras que el nivel de ARNv solo se redujo al 61 %. Sin embargo, con 1 µg de 1/244 ARN DI, los niveles de todos los ARN sintetizados *de novo* a partir del segmento 1 se redujeron en >99 %. Por lo tanto, 1/244 ARN DI tiene un efecto profundo en todos los ARN sintetizados a partir de la diana del segmento 1, pero afecta de manera diferente los niveles de ARN de cadena positiva y cadena negativa.

Para controlar la especificidad de acción del ARN inhibidor, los presentes inventores transfectaron un plásmido del segmento 6 (que codifica el gen NA) en el lugar del plásmido de ARN DI. Las Figuras 4c y 4d muestran que el ARN del segmento 6 fue significativamente menos eficaz inhibiendo la expresión de ARNm, ARNc y ARNv por el segmento 1 diana que 1/244 ARN. Esto es consistente con el nivel más bajo de inhibición de la fluorescencia logrado por el ARN del segmento 6 (Figura 3a). Por lo tanto, 1/244 ARN DI redujo específicamente los niveles de ARNm, ARNc y ARNv, pero el segmento 6 no.

Para determinar cómo afecta el ARN diana a la especificidad de la inhibición de la síntesis y acumulación de ARN mediada por ARN DI, los presentes inventores usaron el segmento 6 como diana. La Figura 5a muestra que la producción de ARNm por el segmento 6 no se vio afectada por 1/244 ARN DI incluso en la cantidad más alta de plásmido 1/244 DI transfectado (1 µg), mientras que los niveles de ARNc y ARNv se redujeron. La cuantificación de 3 ensayos separados mostró que 0,5 µg de 1/244 ARN DI disminuyeron el ARNv codificado en el segmento 6 al 23 % y el ARNc al 32 % del valor de control (Figura 5b).

Los datos descritos anteriormente demuestran que el 1/244 ARN DI derivado del segmento 1 afectó diferencialmente los niveles de ARN producidos a partir del segmento 1 y el segmento 6 del genoma. Dado que también hubo una interferencia entre segmentos entre los ARN DI 2/265 o 3/262 y la expresión de GFP por el segmento 1-GFP (Figura 3a), los presentes inventores investigaron los efectos del 1/244 ARN DI en los niveles de ARN transcritos de los segmentos 2 y 3. Las células se transfectaron con diferentes cantidades de ADN plasmídico 1/244 DI, los plásmidos auxiliares codifican la polimerasa del virus y las proteínas NP y un plásmido que dirige la síntesis de ARNv de segmento 2 o segmento 3 de longitud completa. La Figura 6 (a) y (c) muestra que 1/244 ARN DI redujo los niveles de los tres ARN sintetizados por el segmento 2 o 3. La inhibición de los ARN derivados del segmento 2 se parecía más a la observada con el segmento 1 diana (Figura 4a) que con el ARN del segmento 6 diana (Figura 5a). Hubo una mayor reducción en los niveles de ARNc y ARNm del segmento 2 que en su nivel de ARNv. Sin embargo, se requirió cuatro veces más ADN de plásmido 1/244 para reducir el nivel de ARNm del segmento 2 al 13 % del control de lo que se necesitó con el ARN diana del segmento 1. Hubo una reducción menos pronunciada de los niveles de ARNm, ARNc y ARNv con el segmento 3 diana. Los datos muestran claramente que 1/244 ARN DI reduce los niveles de ARNm sintetizados a partir de los segmentos 1, 2 y 3.

1/244 ARN DI inhibe la síntesis de su propio ARNv de sentido negativo pero no su propio ARN de sentido positivo

A la luz de la capacidad de 1/244 ARN DI para reducir diferencialmente el nivel de ARN codificados en el segmento 1, los presentes inventores investigaron si los niveles de los ARN de sentido positivo y negativo sintetizados a partir del 1/244 ARN DI en el mismo sistema también se vieron afectados. Los geles usados para analizar estos ARN no pudieron separar el ARNc y el ARNm que migraron conjuntamente. Las figuras 7(a) y (b) muestran que en presencia de la diana segmento 1-GFP, los niveles de ARN de sentido positivo de 1/244 DI aumentaron a medida que aumentaban las cantidades de plásmido 1/244 DI transfectado. Por lo tanto, estos fueron máximos en las muestras en las que los niveles de ARNm y ARNc del segmento 1-GFP fueron mínimos (Figura 4a, b). Esto muestra claramente que 1/244 ARN DI no inhibe toda la transcripción dirigida por polimerasa de la gripe. Sin embargo, el nivel de ARNv específico de 1/244 DI fue reproduciblemente máximo con 0,1 µg de ADN de plásmido 1/244 y disminuyó al 13 % del valor máximo con 0,5 µg de plásmido y al 4 % con 1 µg de plásmido (Figura 7b), lo que demuestra que un alta concentración de 1/244 ARN DI reduce el nivel de su propio ARNv producido *de novo*. Cuando se tituló 1/244 de plásmido de ADN en células en ausencia de cualquier ARN diana, los niveles resultantes de 1/244 de ARN de sentido positivo y ARNv fueron similares a aquellos en presencia de ARN diana del segmento 1 (Figura 7c, d).

Análisis

A pesar de los muchos años dedicados a investigar los virus de la gripe DI, la comprensión del mecanismo de acción de la interferencia *in vitro* y la protección contra enfermedades *in vivo* sigue siendo difícil. Una hipótesis común es que el tamaño pequeño del ARN DI le permite competir con el genoma de longitud completa debido a una tasa de replicación más rápida y que la proporción de partículas de virus que contienen genomas DI simplemente refleja los niveles relativos de DI y genomas intactos presentes dentro de las células infectadas (Roux *et al.* 1991; Marriott y Dimmock 2010). Una segunda hipótesis es que el ARN DI tiene una ventaja al competir por un factor limitante vírico o del hospedador. Sin embargo, hay poca evidencia experimental para respaldar cualquiera de estas hipótesis con genomas DI en general y ninguna para el virus DI de la gripe. Más recientemente, una tercera hipótesis sugería que el ARN DI del virus de la gripe interfiere a nivel del empaquetamiento de los ARN genómicos en viriones (Duhaut y McCauley 1996). Además, lo que subyace a esto es la sospecha de que diferentes secuencias de gripe DI tienen diferentes propiedades biológicas (Duhaut 1998; Dimmock *et al.* 2008). Comprender el proceso de interferencia tiene el potencial de proporcionar nuevos enfoques para el desarrollo de nuevos antiviricos basados en genomas DI y el análisis a continuación indica cómo los datos presentados en este informe han mejorado nuestra comprensión de los virus de gripe DI.

1/244 ARN DI interfiere con el empaquetamiento del segmento afín 1 de ARN de virión

La Figura 2 muestra que 1/244 ARN DI interfiere específicamente con el empaquetamiento de su segmento 1 afín de longitud completa ARN en viriones nacientes. Por lo tanto, 1/244 ARN DI actúa de una manera específica del segmento similar a la informada para el segmento 1 derivado del 317 ARN DI en una población de virus no clonada enriquecida por pasaje de dilución límite (Duhaut y McCauley 1996) o para el virus 317 DI clonado (Duhaut y Dimmock 2002). Esto es consistente con los modelos actuales que sugieren que el empaquetamiento de los segmentos del genoma del virus de la gripe requiere la formación de conjuntos o complejos que consisten en una sola copia de cada segmento del genoma y que estos conjuntos actúan como una estructura única que se empaqueta en nuevas partículas de virus (Harris *et al.* 2006; Noda *et al.* 2006). Los datos de los presentes inventores indican que la competición por el empaquetamiento con el ARN genómico completo afín probablemente sea una característica común de todos los ARN DI del virus de la gripe y demuestra que el empaque preferencial del ARN DI enriquece la población de partículas del virus DI a expensas del virus infeccioso.

1/244 ARN DI interfiere con la expresión del segmento 1 afín, con los segmentos 2 y 3 de ARN de virión

El análisis del efecto del genoma DI en la síntesis de ARNm a partir de un ARN del genoma diana del segmento 1 en ausencia de síntesis de partículas víricas, medido directamente o mediante el control de la expresión de un gen indicador mostró que 1/244 ARN DI interfirió con la síntesis de ARN dirigida por una diana derivada del segmento 1 (Figura 3a, b). El nivel de inhibición considerablemente más débil mediado por los ARNv del segmento 4 de longitud completa (Figura 3a) o del segmento 6 (Figura 3a, b) confirmó que este efecto es específico del ARN DI. La inhibición observada con niveles crecientes de ADN plasmídico que expresa los segmentos 4 y 6 del genoma puede deberse a los altos niveles de estos ARN que compiten por un factor limitante como el complejo de polimerasa del virus en las células transfectadas. Por lo tanto, los ARN DI de gripe pueden interferir por mecanismo o mecanismos distintos de y además de, empaquetamiento específico del segmento.

ARN DI puede afectar diferencialmente los niveles de estado estacionario de los diferentes ARN expresados por el ARN diana

La síntesis de ARN de virus positivo (ARNm y ARNc) y de sentido negativo (ARNv) son procesos distintos, como lo evidencia el efecto de mutantes específicos que anulan la función de uno u otro (Jorba *et al.* 2009; Yuan *et al.* 2009) y los datos presentados aquí muestran que 1/244 ARN DI afecta diferencialmente los niveles de estado estacionario de los diferentes productos de ARN expresados por su diana. Las cantidades crecientes de 1/244 ARN DI transfectado condujeron a una reducción drástica en los niveles de ARNm y ARNc derivados del segmento 1 de longitud completa con un efecto menor en los niveles de ARNv; se requirió cuatro veces más ADN de plásmido para reducir el ARNv a los mismos niveles que el ARNm y el ARNc (Figura 4a, b). Por lo tanto, el segmento 1 derivado de 1/244 ARN DI redujo específica y preferentemente el nivel de ARN de sentido positivo hecho a partir de una diana afín, con un efecto considerablemente menor sobre el ARNv de sentido negativo. Esto difiere de un informe anterior de que el virus 317 DI derivado del segmento 1 no inhibió la síntesis de ARN, aunque este estudio no usó virus DI clonado molecularmente (Duhaut y McCauley 1996). Sorprendentemente, 1/244 ARN DI también inhibió fuertemente la síntesis de ARNm de los segmentos 2 y 3 (Figura 6), lo que sugiere que los segmentos genómicos 1-3 (componentes que codifican la ARN polimerasa del virus) comparten características comunes que permiten la acción inhibitoria de los ARN DI de segmento 1. Esto pareció ser recíproco ya que los ARN DI 2/265 y 3/262 también inhibieron la expresión de GFP de la diana del segmento 1 (Figura 3a). Esta es la primera demostración de que un ARN DI de gripe puede afectar dramáticamente a la expresión génica de un segmento del genoma distinto del que surgió. A los niveles de 1/244 ARN DI que redujeron fuertemente el nivel de ARNm diana del segmento 1, sus propios niveles de ARN de sentido positivo fueron máximos (Figura 7a, b). Por lo tanto, de una manera dependiente de la dosis, 1/244 ARN DI preferentemente permite la transcripción de sí mismo mientras suprime la síntesis del ARN de segmento 1 diana.

Los datos en las Figuras 4 y 7 proporcionan la primera evidencia de enriquecimiento de ARN DI. A medida que aumentó la cantidad de 1/244 ADN transfectado, hubo una disminución proporcional en los tres ARN sintetizados por el ARN diana del segmento 1 (Figura 4), mientras que con la transfección de 0,1 µg de 1/244 ADN, todos los ARN transcritos a partir de la plantilla de 1/244 ARN DI aumentaron (Figura 7). Sin embargo, la situación se complica ya que niveles más altos de plásmido provocan una reducción en la cantidad de ARNv DI. Esta reducción parece ser una característica de factores que aún no se comprenden. La disminución observada en los niveles de ARNv DI con el aumento de la entrada del plásmido DI sugiere que podría haber un desequilibrio en la síntesis de los tres ARN DI en los cuales el ARNv, que está modelado por, y por lo tanto depende de, ARNc DI, se pierde. Esto parece ser un fenómeno autolimitado que no se ha descrito previamente para los sistemas de virus DI. En general, estos datos muestran una relación inversa en los niveles de ARN de longitud completa y DI y comienzan a proporcionar una explicación del proceso por el cual el virus DI se vuelve dominante sobre el virus infeccioso.

No se observó la reducción de los niveles de ARNm en 1/244 ARN DI cuando se usaron los segmentos 4 o 6 como la diana, lo que indica que 1/244 ARN DI no interfiere con todos los segmentos del genoma y actúa selectivamente sobre la síntesis de ARN de sentido positivo de los segmentos 1, 2 y 3 (Figuras 3a y 5a). Los segmentos 1, 2 y 3 dirigen la síntesis de niveles considerablemente más bajos de ARNm en relación con el ARNv en comparación con otros segmentos del genoma. Adicionalmente, se ha sugerido que los segmentos 1-3 de ARNm se producen mediante transcripción primaria en lugar de ARNv recién sintetizado (Smith y Hay 1982; Hatada *et al.* 1989). Por lo tanto, la transcripción de los tres segmentos más grandes del genoma parece diferir de la transcripción de los otros segmentos

y los datos presentados aquí sugieren que los ARN DI derivados de los segmentos 1, 2 o 3 pueden suprimir la transcripción de los tres segmentos al afectar a este proceso de transcripción diferente. Durante la infección por gripe se producen grandes cantidades de moléculas cortas de ARN denominadas ARNvp o ARNle (Perez *et al.* 2010; Umbach *et al.* 2010) y estos pueden desempeñar un papel en el cambio de la transcripción a la replicación (Perez *et al.* 2010). Si es correcto, esto plantea la posibilidad de que un ARN DI pueda servir como la plantilla para la producción de ARNvp, que a su vez modulan la producción de los productos de replicación ARNv, ARNc y ARNm. Se desconoce el mecanismo o mecanismos por los que estos diferentes procesos sintéticos en los segmentos 1, 2 y 3 se ven afectados y será de interés investigar si la capacidad de regular los productos de replicación es común a todos los ARN DI o si es una propiedad solo de ARN DI específicos. Esto puede significar que la gran cantidad de ARN DI que pueden producirse durante una infección por el virus de la gripe, varían en su eficiencia de interferencia. La exploración adicional proporcionará información sobre la regulación diferencial de la transcripción de los segmentos del genoma de la gripe.

Un modelo de interferencia por 1/244 ARN DI

Los ARNm DI que retienen el codón de iniciación AUG del marco de lectura abierto principal tienen el potencial de traducirse en péptidos PB2 truncados, como se demostró para algunos ARN DI derivados del segmento 1 (Akkinä *et al.* 1984) y polipéptidos cortos similares que contenían el dominio de unión a la proteína PA del PB1 inhibieron fuertemente la actividad de la ARN polimerasa del virus (Wunderlich *et al.* 2009; Manz *et al.* 2011). Por lo tanto, en principio, un polipéptido relacionado con PB2 truncado derivado de 1/244 ARN DI también podría ejercer un efecto negativo dominante sobre la actividad de la polimerasa del virus. Sin embargo, los presentes inventores excluyeron esta posibilidad generando una forma de 1/244 ARN DI en donde el codón de iniciación AUG para PB2 y dos codones AUG en dirección 3' en marco que podrían dirigir la síntesis de un polipéptido corto del ORF de PB2 estaban mutados (Meng *et al.*, presentado para su publicación). Los presentes inventores confirmaron que este ARN DI de inactivación génica 1/244 AUG era indistinguible en acción del ARN DI parental 1/244. Generó ARNv y ARNm a niveles similares a 1/244 ARN DI e inhibió la expresión de GFP del segmento 1 como se ve con 1/244 ARN DI. Además, el virus DI que contenía el 1/244 ARN AUG de inactivación génica protegió a los ratones de la enfermedad después de la exposición con el virus de la gripe de manera similar al virus 1/244 DI. Estos datos muestran que la actividad de 1/244 DI es únicamente un fenómeno basado en el ARN.

La capacidad de los ARN DI del virus de la gripe para suplantar su segmento del genoma afín durante el proceso de empaquetamiento explica su amplificación en las preparaciones de virus. Sin embargo, los datos anteriores excluyen la opinión generalizada de que el mecanismo de interferencia dentro de las células resulta únicamente de la capacidad del ARN DI para replicarse más rápido que el ARN de longitud completa afín más largo. Más bien, los ARN DI también se dirigen específicamente a la síntesis de ARN del virus. Los datos que se muestran aquí indican que la consecuencia principal de la interferencia mediada por 1/244 ARN DI dentro de la célula es la inhibición dirigida de la síntesis de ARN dirigida por los segmentos 1, 2 y 3 de ARN de longitud completa y que los ARN DI derivados de los segmentos 2 y 3 también inhiben la síntesis de ARN del segmento 1 de longitud completa.

Ejemplo 2 - La expresión de proteína codificada por ARN DI no es necesaria para la interferencia

Material y métodos

Plásmidos y producción de virus infecciosos por genética inversa

Los plásmidos que codifican los 8 segmentos génicos de la cepa A/WSN de A/WS/33 y plásmidos que expresan las proteínas polimerasa y NP (Neumann *et al.* 1999) y el vector que expresa 244 ARN DI de los promotores Poll se ha descrito previamente (Dimmock *et al.* 2008; Duhaut y Dimmock 2002). El 244 ARN comprende 395 nucleótidos y derivó del segmento 1 de A/Puerto Rico/8/34 (H1N1). La diana del segmento 1, segmento 1-GFP, se creó amplificando el ORF de GFP mediante PCR e insertándolo en pPoll-220 (Duhaut y Dimmock, 2000) de tal manera que el ORF de GFP coincidiera con el ORF de PB2, dando el plásmido seg 1-GFP que expresa el segmento 1-GFP ARN (Meng *et al.* 2012). El plásmido reportero GFP retiene el término exacto 5' (220 nt) y 3' (48 nt) del segmento 1. Se transfectaron células 293T humanas con plásmidos como se describió anteriormente (Dimmock *et al.* 2008). Brevemente, se transfectaron células 293T confluentes al 70 % en una placa de 12 pocillos usando el reactivo de transfección TransIT LT1 (Mirus) con 8 plásmidos de expresión Poll que codifican plásmidos de ADNc y ARN sentido vírico para la expresión de proteínas PB2, PB1, PA y NP, con o sin pPoll-244 o pPoll-244 de inactivación génica. Las células transfectadas se incubaron después a 37 °C durante la noche antes de cocultivar con células MDCK en un matraz de 25 cm². Finalmente, el virus en fluidos de cultivo de tejidos se pasó una vez en huevos de pollo embrionados y se recogieron fluidos alantoideos para producir una reserva de virus (Dimmock *et al.* 2008).

El virus producido en huevos de pollo embrionados es una mezcla de virus DI 244 o virus 244 DI de inactivación génica AUG empaquetado en proteínas de virión A/WSN y virus auxiliar infeccioso A/WSN. Estos se purificaron por centrifugación diferencial a través de sacarosa y se resuspendieron en PBS. Las soluciones madre se estandarizaron de acuerdo con su título de hemaglutinación y se almacenaron en nitrógeno líquido. La reserva de virus DI se irradió con UV para eliminar la infectividad del virus auxiliar mediante una ráfaga corta (40 segundos) de radiación UV a 253,7 nm (0,64 mW/cm²). Esto es "virus DI activo". La diana UV es el ARN vírico, pero la UV tiene un efecto

relativamente pequeño en el ARN DI debido a su pequeño tamaño diana, 395 nt en comparación con 13.600 nt para virus infecciosos. La irradiación UV más prolongada (8 minutos) inactiva la actividad protectora para los ratones, pero no afecta las actividades de la hemaglutinina o la neuraminidasa, por lo que controla cualquier efecto estimulante del sistema inmunitario o bloqueador de los receptores de las partículas del virus 244 DI ("virus DI inactivado"). El

5 rendimiento del virus DI A/WSN de inactivación génica 244 AUG y su comportamiento en la purificación fueron muy similares a los del virus DI A/WSN 244 AUG (datos no mostrados).

Mutación

10 Se llevaron a cabo dos etapas secuenciales de mutagénesis dirigida al sitio para mutar los tres codones de inicio en el 244 DI ARN. Se usaron un par de cebadores para la mutagénesis dirigida al sitio para convertir el primer AUG en AUC usando un plásmido pPoll-244 como molde y ADN polimerasa pfu (Promega). La mutación se confirmó mediante secuenciación. La segunda ronda de mutagénesis dirigida al sitio se realizó usando cebadores que alteraron los

15 codones de inicio segundo y tercero de AUG a AUC usando la construcción producida a partir de la primera ronda de mutagénesis. La construcción resultante se confirmó de nuevo mediante secuenciación.

Análisis de transferencia Northern

20 El ARN celular total se aisló de células infectadas con DI usando Trizol. Se seleccionó ARNm que contenía poli A usando un kit de preparación de ARNm GenElute Direct (Sigma) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se retuvo el ARN no poliadenilado que no se unió a la columna durante la preparación del ARNm. Las alícuotas de ARN total, el ARNm y el ARN no poliadenilado se separaron mediante electroforesis en gel de glioxal-agarosa. Después de la electroforesis, el ARN se transfirió a una membrana Hybond-N (GE Healthcare) durante la noche usando 20x SSC. La membrana se coció después a 80 °C durante 2 h. Se preparó una sonda del segmento 1 de sentido negativo de

25 longitud completa mediante transcripción *in vitro* en presencia de DIG-UTP (Roche) a partir de un producto de PCR que contiene un promotor del bacteriófago T7. La membrana se hibridó con la sonda marcada con DIG durante la noche y la señal se detectó usando un fragmento de anticuerpo AP FAB específico de digoxigenina y sustrato CSPD (Roche).

Análisis de extensión de cebadores

30 El análisis de extensión de cebadores se llevó a cabo en el ARN celular total (Rehwinkel *et al.* 2010). El ARN total (2 µg) se mezcló con cebadores marcados con [³²P] en el extremo 5' y dNTP en un volumen total de 13 µl. La mezcla se calentó a 65 °C durante 5 min y se colocó en hielo durante 1 min. Se añadieron 2x tampón de primera hebra, DTT 20 mM y 100 U de transcriptasa inversa SuperScript III (Invitrogen) y se incubaron a 55 °C durante 1 h. La reacción se terminó calentando a 95 °C durante 5 min con colorante de carga de gel II (Ambion). Los productos de transcripción se resolvieron en un gel de poliacrilamida al 6 % (p/v) que contenía urea 7 M en tampón TBE y se detectaron mediante imágenes de fósforo.

Interferencia medida por la inhibición de GFP

Las células 293T se transfectaron con el plásmido que expresa segmento 1-GFP, plásmidos que expresan proteínas PB1, PB2, PA y NP y cantidades crecientes de un plásmido Poll adicional que expresa un ARN DI de inactivación 244 DI o 244 AUG. A 2 días después de la transfección, los cultivos se examinaron para determinar la expresión de GFP.

45 Se tomaron imágenes digitales de las monocapas celulares mediante microscopía de epifluorescencia y contraste de fase. Se seleccionaron aleatoriamente cinco imágenes de fluorescencia de campo y se analizaron para la proporción del área visualizada que expresa GFP usando el software HCLImage (Hamamatsu). La visualización detecta células que expresan un intervalo de niveles de GFP para incluir aquellas que pueden haber sido transfectadas con diferentes niveles de los plásmidos indicadores. Se calculó una media para dar el porcentaje del área positiva de GFP por

50 monocapa.

Protección de ratones contra la gripe con virus DI

Para evaluar el grado de protección que ofrece el virus DI, se inocularon ratones C3H/He-mg por vía intranasal en anestesia ligera con éter con A/WSN solo (10 LD₅₀ o 1000 uff), una mezcla de A/WSN + virus DI activo o A/WSN + virus DI inactivado. Los ratones se monitorizaron posteriormente para la enfermedad clínica de acuerdo con el protocolo convencional de los presentes inventores y para pérdida de peso como se describió anteriormente (Dimmock *et al.* 2008). Los ratones supervivientes se expusieron 3 semanas después de la infección con una dosis alta de A/WSN (10.000 LD₅₀) para determinar su estado inmunológico.

60

Resultados

Potencial de codificación de 244 ARN DI

65 244 ARN DI, una molécula de 395 nucleótidos, surgió del segmento 1 de PR8 como resultado de uno o más eventos de delección que dejaron 244 nucleótidos en el extremo 3' y 151 nucleótidos en el extremo 5' del ARN de sentido

positivo (Dimmock *et al.* 2008). El ARN 244 retiene las señales en el extremo del segmento del genoma que dirigen la transcripción del ARNm (Figura 1a). Durante la replicación, el virus de la gripe produce dos formas de ARN de sentido positivo. La replicación implica la síntesis de copias de sentido positivo (ARNc) de los ARNv del genoma del virus infectante, que a su vez se usan como moldes para la síntesis de nuevos ARNv (Palese y Shaw, 2007). La síntesis de ARNm del virus de la gripe se inicia usando un cebador escindido del extremo 5' con protección terminal del ARNm hospedador y su síntesis termina antes del final del ARNv molde, antes de la poliadenilación (Dias *et al.* 2009; Fechter *et al.* 2003; Guilligay *et al.* 2008; Plotch *et al.* 1981). Por lo tanto, el ARNm difiere del ARNc intermedio de replicación de sentido positivo en que tiene la extensión 5' derivada del cebador y en que está truncado y poliadenilado en el extremo 3'. Para confirmar que el 244 ARN DI puede dirigir la síntesis de ARNm, se investigaron los ARN presentes en células infectadas con el virus 244 DI. El análisis de transferencia Northern usando una sonda específica del segmento 1 para detectar ARN de sentido positivo identificó dos ARNm de virus poliadenilados en células infectadas (Figura 2a). El ARNm más grande de aproximadamente 2,3 kb es coherente con el ARNm derivado del segmento 1 del genoma de longitud completa proporcionado por el virus auxiliar. El ARNm más pequeño de aproximadamente 500 bases indica que el ARN 244 DI dirige la síntesis de ARNm. El ARN de sentido positivo visto en la fracción de ARN no poliadenilado es ARNc y, como era de esperar, puede verse que es ligeramente más pequeño que el ARNm derivado de 244 DI.

El ARNm transcrito por 244 ARN DI contiene el codón de inicio de traducción del marco de lectura abierto 1 (ORF-1) de PB2, lo que otorga a 244 ARN DI la capacidad de codificar una proteína que comprende los primeros 41 restos de aminoácidos de PB2 fusionados con 21 restos de aminoácidos traducidos de un marco de lectura diferente generado como resultado de la eliminación, produciendo una proteína de 62 restos en total (Figura 9b). Esta proteína putativa contiene todo el dominio de unión a PB1 de los restos 1-35 (Sugiyama *et al.* 2009) y el dominio de localización mitocondrial de los restos 1-22 (Carr *et al.* 2006). El ORF de PB2 tiene tres posibles codones de inicio AUG. El contexto de secuencia para el primer AUG (el codón de inicio auténtico para PB2) es muy bueno, mientras que el segundo y el tercero son malos. Sin embargo, para estar seguros de que no podría haber iniciación de la traducción, los presentes inventores mutaron los tres posibles codones de inicio (a AUC); después se confirmó la secuencia. El nuevo ARN se conoce como ARN DI de inactivación génica 244 AUG.

244 A UG de inactivación génica ARN DI y 244 ARN DI interfieren con la expresión de un segmento 1 ARN en cultivo celular en un grado similar

Los ARN se recogieron 2 días después de transfectar células T 293 con plásmido que codificaba el ARN DI 244 o el ARN DI de inactivación génica 244 AUG junto con plásmidos que expresaban las proteínas PB2, PB1, PA y NP. El análisis de extensión del cebador mostró que los ARN DI de inactivación génica 244 y 244 AUG sintetizaron cantidades similares de ARNm y ARNv, lo que confirma que la transcripción no se vio afectada por las mutaciones en el ARN DI de inactivación génica 244 AUG (Figura 10b).

Para investigar la capacidad de interferencia del ARN de inactivación génica 244 AUG, los presentes inventores usaron un ensayo de expresión de GFP en donde la transcripción y replicación de un ARN del segmento 1 en donde la mayor parte de la región codificante de PB2 se había reemplazado por GFP (segmento 1-GFP) se permitió mediante la cotransfección de plásmidos que expresan proteínas PB1, PB2, PA y NP en células 293T. Este sistema permite la síntesis de ARN vírico pero no la formación de partículas víricas ya que no se incluyeron los plásmidos que codifican proteínas estructurales clave (HA, NA, M1 y M2). Los efectos de los plásmidos codificantes de ARN DI cotransfectados se evaluaron mediante el control de la fluorescencia de GFP. La Figura 11a compara la expresión de fluorescencia en un cultivo de control positivo en ausencia de ARN DI con cultivos transfectados con diversas cantidades de plásmido 244 o plásmido de inactivación génica AUG 244. Esto mostró que ambos plásmidos inhibieron fuertemente la fluorescencia de una manera dependiente de la dosis, por ejemplo, 0,5 µg del plásmido 244 o del plásmido de inactivación génica AUG 244 inhibieron la fluorescencia de GFP en más del 90 % (Figura 11b).

El virus DI de inactivación génica 244 A UG protege a los ratones de un desafío letal del virus de la gripe A

Comparamos la actividad de protección de 244 DI y ARN DI de inactivación génica 244 AUG en el modelo de ratón de los presentes inventores C3H/He-mg usando A/WSN como el virus de exposición (Dimmock *et al.* 2008). Los ratones se infectaron por vía intranasal en anestesia ligera con A/WSN solo o con A/WSN + virus 244 DI o A/WSN + virus 244 AUG de atenuación génica DI. Otros grupos infectados recibieron virus DI que había sido irradiado con UV durante 8 minutos para destruir la actividad protectora de DI y para controlar cualquier efecto no específico del inóculo de virus DI. Se controló a los ratones en cuanto a enfermedad clínica y pérdida de peso. La Figura 12a, b muestra que todos los ratones control infectados con virus se enfermaron gravemente con una pérdida de peso sustancial y tuvieron que ser sacrificados. Por el contrario, ninguno de los ratones tratados con el virus DI 244 o el virus DI de inactivación génica 244 AUG desarrolló ningún signo de enfermedad clínica. Los ratones tratados con el virus DI 244 y el virus DI de inactivación génica 244 AUG mostraron una caída transitoria de peso (Figura 12b). La pérdida de peso es el criterio más sensible de enfermedad y no es raro ver este intervalo de variación en ausencia de cualquier enfermedad clínica. Como se esperaba de los datos anteriores (Dimmock *et al.* 2008), los ratones tratados con el virus DI inactivado con UV no estaban protegidos. Anteriormente, los presentes inventores han demostrado que los animales tratados con el virus 244 DI simultáneamente con el virus infeccioso generan inmunidad protectora que previene la enfermedad después de una exposición posterior con una dosis alta del mismo virus en ausencia de un tratamiento adicional con

el virus DI (Dimmock *et al.* 2008). Los animales tratados con el virus 244 DI de inactivación génica eran sólidamente inmunes a un desafío adicional con una dosis alta de A/WSN, lo que mostraba que habían sido infectados aunque no desarrollaron signos de enfermedad clínica (Figura 12c, d).

5 Análisis

Aunque los virus de la gripe DI se conocen desde hace más de 60 años, ha habido poca indicación de los mecanismos moleculares por los cuales funciona su actividad de interferencia *in vitro* o actividad protectora *in vivo*. Inicialmente, el problema era insoluble ya que las preparaciones de virus DI naturales contienen una diversidad de secuencias de ARN defectuosas y, por lo tanto, no podían analizarse las propiedades biológicas de las secuencias DI individuales. Sin embargo, el uso de virus DI clonados generados mediante genética inversa nos ha permitido abordar este problema. Nuestro trabajo reciente ha demostrado que el ARN 244 DI que deriva del segmento 1 del genoma interfiere de tres maneras: competición con el segmento afín de longitud completa por el empaquetado, interferencia con la síntesis y/o acumulación de la polimerasa que codifica los segmentos 1, 2 y 3 de ARN del virión de longitud completa y estimulación del interferón tipo I *in vivo*. Aquí, los presentes inventores han demostrado que el ARN DI de gripe 244 dirige la síntesis de ARNm poliadenilado (Figura 10a). El ARNm es más grande que el ARNc de sentido positivo como se esperaba para todos los ARNm del virus de la gripe, lo que indica que el ARN DI es una plantilla para la transcripción. El ARNm producido a partir de 244 ARN DI contendrá, por lo tanto, una protección terminal en 5' y una cola poli A y estará potencialmente disponible para su traducción en proteína. La secuencia del ARN de 244 DI predice que el ARNm de DI puede traducirse en una proteína que comparte los 41 restos de aminoácidos amino terminales de PB2. Se ha demostrado que esta región de PB2 se une a la proteína PB1 del complejo de polimerasa y también se localiza en las mitocondrias de la célula hospedadora (Carr *et al.* 2006; Sugiyama *et al.* 2009).

Un ARN mutante de 244 DI en el cual los tres codones de iniciación de la traducción AUG en marco del ORF de PB2 se convirtieron en AUC y el cual era por lo tanto incapaz de expresar la proteína relacionada con PB2, retuvo las propiedades del 244 ARN DI original. El ARN DI de inactivación génica 244 AUG pudo interferir con la expresión génica del segmento 1 del virus de la gripe *in vitro* en la misma medida que se ve con 244 ARN DI (Figura 10b y Figura 11). Lo que es más importante, el ARN DI de inactivación génica 244 AUG retuvo la capacidad de proteger a los ratones de una enfermedad después de la administración de una dosis letal del virus de la gripe (Figura 12). Por lo tanto, la mutación no tuvo efecto sobre la interferencia *in vitro* y la protección *in vivo* por 244 ARN DI.

Los presentes inventores concluyen que la interferencia *in vitro* y la protección *in vivo* contra la enfermedad del virus de la gripe no está mediada por el péptido PB2 truncado que está codificado y puede estar sintetizado por 244 ARN DI y, por lo tanto, estos procesos están controlados por la propia molécula de ARN DI.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> THE UNIVERSITY OF WARWICK

<120> ENSAYO Y MEDICAMENTO

<130> N401234WO

<150> GB1400752.0

<151> 16/01/2014

<160> 25

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 395

<212> ADN

<213> Virus de la gripe

<400> 1

ES 2 913 063 T3

agcgaaagca ggtcaaatat attcaatatg gaaagaataa aagaactaag aaatctaatag	60
tcgcagtctc gcacccgcga gatactcaca aaaaccaccg tggaccatat ggccataatc	120
aagaagtaca catcaggaag acaggagaag actgagggga ttcctcattc tgggcaaaga	180
ggacaagaga tatgggccag cactaagcat caatgaactg agcaaccttg cgaaaggaga	240
gaaggctaata gtgctaattg ggcaagggga tgtggtgttg gtaatgaaac ggaaacggga	300
ctctagcata cttactgaca gccagacagc gaccaaaga attcggatgg ccatcaatta	360
gtgtcgaata gtttaaaaac gaccttgttt ctact	395

<210> 2

<211> 2341

<212> ADN

<213> Virus de la gripe

<400> 2

agcgaaagca ggtcaattat attcaatatg gaaagaataa aagaactaag aaatctaatag	60
tcgcagtctc gcacccgcga gatactcaca aaaaccaccg tggaccatat ggccataatc	120
aagaagtaca catcaggaag acaggagaag aaccagcac ttaggatgaa atggatgatg	180
gcaatgaaat atccaattac agcagacaag aggataacgg aaatgattcc tgagagaaat	240
gagcaaggac aaactttatg gagtaaaatg aatgatgccg gatcagaccg agtgatggta	300
tcacctctgg ctgtgacatg gtggaatagg aatggaccaa tgacaaatac agttcattat	360
ccaaaaatct acaaaactta ttttgaaaga gtcgaaaggc taaagcatgg aacctttggc	420
cctgtccatt ttagaaacca agtcaaaata cgtcggagag ttgacataaa tcctggtcat	480
gcagatctca gtgccaagga ggcacaggat gtaatcatgg aagttgtttt ccctaacgaa	540
gtgggagcca ggatactaac atcggaatcg caactaacga taaccaaaga gaagaaagaa	600
gaactccagg attgcaaaat ttctcctttg atggttgcac acatgttgga gagagaactg	660

ES 2 913 063 T3

gtccgcaaaa	cgagattcct	cccagtggtc	ggtggaacaa	gcagtgtgta	cattgaagtg	720
ttgcatttga	ctcaaggaac	atgctgggaa	cagatgtata	ctccaggagg	ggaagtgaag	780
aatgatgatg	ttgatcaaag	cttgattatt	gctgctagga	acatagttag	aagagctgca	840
gtatcagcag	accactagc	atctttattg	gagatgtgcc	acagcacaca	gattggtgga	900
attaggatgg	tagacatcct	taagcagaac	ccaacagaag	agcaagccgt	gggtatatgc	960
aaggctgcaa	tgggactgag	aattagctca	tccttcagtt	ttggtggatt	cacatttaag	1020
agaacaagcg	gatcatcagt	caagagagag	gaagaggtgc	ttacgggcaa	tcttcaaaca	1080
ttgaagataa	gagtgcata	gggatatgaa	gagttcacia	tgggtgggag	aagagcaaca	1140
gccataactca	gaaaagcaac	caggagattg	attcagctga	tagtgagtgg	gagagacgaa	1200
cagtcgattg	ccgaagcaat	aattgtggcc	atggtatttt	cacaagagga	ttgtatgata	1260
aaagcagtta	gaggtgatct	gaatttcgtc	aataggcgga	atcagcgact	gaatcctatg	1320
catcaacttt	taagacattt	tcagaaggat	gcgaaagtgc	tttttcaaaa	ttggggagtt	1380
gaacctatcg	acaatgtgat	gggaatgatt	gggatattgc	ccgacatgac	tccaagcatc	1440
gagatgtcaa	tgagaggagt	gagaatcagc	aaaatgggtg	tagatgagta	ctccagcacg	1500
gagagggtag	tggtagcat	tgaccgggtc	ttgagagtcc	gggaccaacg	aggaaatgta	1560
ctactgtctc	ccgaggaggt	cagtgaacaa	cagggaacag	agaaactgac	aataacttac	1620
tcactgtcaa	tgatgtggga	gattaatggt	cctgaatcag	tgttgggtcaa	tacctatcaa	1680
tggatcatca	gaaactggga	aactgttaaa	attcagtggg	cccagaaccc	tacaatgcta	1740
tacaataaaa	tggaatttga	accatttcag	tcttttagtac	ctaaggccat	tagaggccaa	1800
tacagtgggt	ttgtgagaac	tctgttccaa	caaagtgggg	atgtgcttgg	gacatttgat	1860
accgcacaga	taataaaact	tcttccttc	gcagccgctc	caccaaagca	aagtagaatg	1920
cagttctcct	catttactgt	gaatgtgagg	ggatcaggaa	tgagaatact	tgtaaggggc	1980
aattctcctg	tattcaacta	caacaaggcc	acgaagagac	tcacagttct	cggaaaggat	2040
gctggcactt	taaccgaaga	cccagatgaa	ggcacagctg	gagtggagtc	cgctgttctg	2100
aggggattcc	tcattctggg	caaagaagac	aggagatatg	ggccagcatt	aagcatcaat	2160
gaactgagca	accttgcgaa	aggagagaag	gctaattgtgc	taattgggca	aggagacgtg	2220
gtgttggtaa	tgaaacgaaa	acgggactct	agcatactta	ctgacagcca	gacagcgacc	2280
aaaagaattc	ggatggccat	caattagtgt	cgaatagttt	aaaaacgacc	ttgtttctac	2340
t						2341

<210> 3

<211> 2341

<212> ADN

<213> Virus de la gripe

<400> 3

ES 2 913 063 T3

agcaaaagca ggtcaattat attcagtatg gaaagaataa aagaactacg gaatctgatg	60
tgcagtcctc gcactcgcga gatactgaca aaaaccacag tggaccatat ggccataatt	120
aaaaagtaca catcgggggag acaggaaaag aacccgtcac ttaggatgaa atggatgatg	180
gcaatgaaat acccaatcac tgctgacaaa aggataacag aaatgggtcc ggagagaaat	240
gaacaaggac aaactctatg gagtaaaatg agtgatgctg gatcagatcg agtgatggta	300
tcacctttgg ctgtaacatg gtggaataga aatggaccgc tgacaagtac ggtccattac	360
ccaaaagtat acaagactta ttttgacaaa gtcgaaaggt taaaacatgg aacctttggc	420
cctgttcatt ttagaaatca agtcaagata cgcagaagag tagacataaa ccctggtcac	480
gcagacctca gtgccaaaga ggcacaagat gtaattatgg aagttgtttt tcccaatgaa	540
gtgggagcca ggatactaac atcagaatcg caattaacaa taactaaaga gaaaaagaa	600
gaactccgag attgcaaaat ttctcccttg atgggtgcat acatgttaga gagagaactt	660
gtacggaaaa caagatttct ccagttgct ggcggaacaa gcagtatata cattgaagtt	720
ttacatttga ctcaaggaac gtgttgggaa caaatgtaca ctccaggtgg agaagtgagg	780
aatgacgata ttgaccaaag cctaattatt gcggccagga acatagtaag aagagccgca	840
gtatcagcag atccactagc atctttattg gagatgtgcc acagcacaca aattggcggg	900
acaaggatgg tggacattct tagacagaac ccaactgaag aacaagctgt ggatatatgc	960
aaggctgcaa tgggattgag aatcagctca tccttcagct ttggtgggtt tacatttaaa	1020
agaacaagcg ggtcatcagt caaaaaagag gaagaagtgc ttacaggcaa tctccaaaca	1080
ttgaagataa gagtacatga ggggtatgag gagttcaciaa tgggtggggaa aagagcaaca	1140
gctatactaa gaaaagcaac cagaagattg gttcagctca tagtgagtgg aagagacgaa	1200
cagtcaatag ccgaagcaat aatcgtggcc atgggtgttt cacaagagga ttgcatgata	1260
aaagcagtta gaggtgacct gaatttcgtc aacagagcaa atcagcgggt gaaccccatg	1320
catcagcttt taaggcattt tcagaaagat gcgaaagtgc tttttcaaaa ttggggaatt	1380
gaacacatcg acagtgtgat gggaatgatt ggagtattac cagatatgac tccaagcaca	1440
gagatgtcaa tgagaggaat aagagtcagc aaaatgggtg tggatgaata ctccagtaca	1500
gagaggggtg tggtagcat tgatcgggtt ttgagagttc gagaccaacg tgggaatgta	1560
ttattatctc ctgaggaggt cagtgaaaca cagggaactg agagactgac aataacttat	1620
tcacgtcga tgatgtggga gattaacggt cctgagtcgg ttttgggtcaa tacctatcaa	1680
tggatcatca gaaattggga agctgtcaaa attcaatggt ctccagaatcc tgcaatgttg	1740
tacaacaaaa tggaatttga accatttcaa tctttagtcc ccaaggccat tagaagccaa	1800

ES 2 913 063 T3

tacagtgggt	ttgtcagaac	tctattccaa	caaatgagag	acgtacttgg	gacatttgac	1860
accacccaga	taataaagct	tctccctttt	gcagccgctc	caccaaagca	aagcagaatg	1920
cagttctctt	cactgactgt	aaatgtgagg	ggatcagga	tgagaatact	tgtaaggggc	1980
aattctcctg	tattcaacta	caacaagacc	actaaaagac	taacaattct	cggaaaagat	2040
gccggcactt	taattgaaga	cccagatgaa	agcacatccg	gagtggagtc	cgccgtcttg	2100
agagggtttc	tcattatagg	taaggaagac	agaagatacg	gaccagcatt	aagcatcaat	2160
gaactgagta	accttgcaaa	aggggaaaag	gctaattgtc	taatcgggca	aggagacgtg	2220
gtgttggtta	tgaacgaaa	acgggactct	agcatactta	ctgacagcca	gacagcgacc	2280
aaaagaattc	ggatggccat	caattaatgt	tgaatagttt	aaaaacgacc	ttgtttctac	2340
t						2341

<210> 4

<211> 2341

<212> ADN

<213> Virus de la gripe

<400> 4

agcaaaagca	ggtcaattat	attcagtatg	gaaagaataa	aagaactacg	gaacctgatg	60
tcgcagtctc	gcactcgcga	gatactaaca	aaaaccacag	tggaccatat	ggccataatt	120
aagaagtaca	catcagggag	acaggaaaag	aaccgcgtcac	ttaggatgaa	atggatgatg	180
gcaatgaaat	atccaatcac	tgctgacaaa	aggataacag	aaatggttcc	ggagagaaat	240
gaacaaggac	aaactctatg	gagtaaaatg	agtgatgctg	ggtcagatcg	agtgatggta	300
tcacctttgg	ctgtgacatg	gtggaataga	aatggacctg	tgacaaatac	ggttcactat	360
ccaaaagtat	acaagactta	ttttgacaaa	gtcgaaaggt	taaaacatgg	aacctttggc	420
cctgttcatt	ttagaaatca	agtcaagata	cgcgaagag	tggacataaa	ccctggtcac	480
gcagacctca	gtgccaagga	ggcacaagat	gtaattatgg	aagttgtttt	ccccaatgaa	540
gtgggagcca	ggatactaac	atcagaatca	caattaacaa	taaccaaaga	gaaaaaagaa	600
gaactccgag	attgcaaaat	ttctcctttg	atggttgcat	acatgttaga	gagggaactt	660
gtccgaaaaa	cgagattttc	cccagttgct	ggcggaacaa	gcagtatata	cattgaagtt	720
ttacatttga	ctcaaggaac	gtgttgggaa	caaatgtaca	ctccaggtgg	agaagtgagg	780
aatgacgatg	ttgaccaaag	cctaattatt	gcagccagga	acatagtgag	aagagccgca	840
gtatcagcag	atccactagc	atctttattg	gagatgtgcc	acagcacaca	aattggcggg	900
acaaggatgg	tggacattct	taggcagaac	ccgacggaag	aacaagctgt	ggatatatgc	960
aaggctgcaa	tgggattgag	aatcagctca	tccttcagct	ttggtgggtt	tacattttaa	1020
agaacaagcg	ggatcatcagt	caaaagagag	gaagaagtgc	ttacaggcaa	tctccaaaca	1080

ES 2 913 063 T3

ttgaaaataa gagtacaatga ggggtacgag gagttcaciaa tgggtggggaa aagagcaaca	1140
gctataactca gaaaagcaac caggagattg gttcaactca tagtgagtgg aaggacgaa	1200
cagtcaatag ccgaagcaat aatcgtggcc atggtgtttt cacaagagga ttgcatgata	1260
aaagcagtta gaggtgacct gaatttcggt aacagggcaa atcagcggtt gaaccccatg	1320
catcagcttt taaggcattt tcagaaagat gcgaaggtgc tttttcagaa ttggggaatt	1380
gaacacatcg acagtgtgat gggaatggtt ggagtattac cagatatgac tccaagcaca	1440
gagatgtcaa tgagaggaat aagagtcagc aaaatgggagc tggatgaata ctccagcaca	1500
gagaggggtgg tgggttagcat tgatcggttt ttgagagttc gagaccaacg tgggaatgta	1560
ttattatctc ctgaggaggt cagtgaacaa cagggaacag agagactgac aataacttac	1620
tcacgtcaa tgatgtggga gattaacggt cctgagtcgg ttttggtaa tacctatcaa	1680
tgggtcatca gaaattggga aactgtcaaa attcaatggt ctgagaatcc tgcaatgttg	1740
tacaacaaaa tggaatttga accatttcaa tcttttagttc ctaaggccat tagaggccaa	1800
tacagtggat ttgtcagaac tctattccaa caaatgagag atgtacttgg gacatttgat	1860
accatccaga taataaagct tctccctttt gcagccgctc caccaaagca aagcagaatg	1920
cagttctctt cattgactgt aaatgtgagg ggatcaggga tgagaatact tgtaaggggc	1980
aattctcctg tattcaacta caacaagacc actaaaagac taacaattct cggaaaagat	2040
gccggcactt taattgaaga cccagatgaa agcacatccg gagtggagtc cgctgtcttg	2100
agaggatttc tcattctagg taaggaagac agaagatacg gaccagcatt aagcatcaat	2160
gaactgagta accttgcaaa aggggaaaag gctaattgtgc taattgggca aggagacgtg	2220
gtgttggtaa tgaaacgaaa acgggactct agcatactta ctgacagcca gacagcgacc	2280
aaaagaattc ggatggccat caattaatgt tgaatagttt aaaaacgacc ttgtttctac	2340
t	2341

<210> 5

<211> 2341

<212> ADN

<213> Virus de la gripe

<400> 5

agcgaaagca ggcaaaccat ttgaatggat gtcaatccga ccttactttt cttaaaagtg	60
ccagcacaaa atgctataag cacaactttc ccttataccg gagaccctcc ttacagccat	120
gggacaggaa caggatacac catggatact gtcaacagga cacatcagta ctgagaaaag	180
gcaagatgga caacaaacac cgaaactgga gcaccgcaac tcaacccgat tgatgggcca	240
ctgccagaag acaatgaacc aagtgggtat gcccaaacag attgtgtatt ggaagcaatg	300
gctttccttg aggaatccca tcctgggtatt ttgaaaact cgtgtattga aacgatggag	360

ES 2 913 063 T3

gttggttcagc aaacacgagt agacaagctg acacaaggcc gacagaccta tgactggact	420
ttaaatagaa accagcctgc tgcaacagca ttggccaaca caatagaagt gttcagatca	480
aatggcctca cggccaatga gtctggaagg ctcatagact tccttaagga tgtaatggag	540
tcaatgaaaa aagaagaaat ggggatcaca actcattttc agagaaagag acgggtgaga	600
gacaatatga ctaagaaaat gataacacag agaacaatag gtaaaaggaa acagagattg	660
aacaaaagga gttatctaata tagagcattg accctgaaca caatgaccaa agatgctgag	720
agagggaagc taaaacggag agcaattgca accccaggga tgcaaataag ggggtttgta	780
tactttgttg agacactggc aaggagtata tgtgagaaac ttgaacaatc agggttgcca	840
gttgagggca atgagaagaa agcaaagttg gcaaagtgtg taagggaagat gatgaccaat	900
tctcaggaca ccgaactttc tttgaccatc actggagata acaccaaata gaacgaaaa	960
cagaatcctc ggatgttttt gcccatgatc acatatatga ccagaaatca gcccgaaatg	1020
ttcagaaatg ttctaagtat tgctccaata atgttctcaa acaaaatggc gagactggga	1080
aaagggtata tgtttgagag caagagtatg aaacttagaa ctcaaatacc tgcagaaatg	1140
ctagcaagca ttgatttgaa atatttcaat gattcaacaa gaaagaagat tgaaaaaatc	1200
cgaccgctct taatagaggg gactgcatca ttgagccctg gaatgatgat gggcatgttc	1260
aatatgttaa gcaactgtatt aggcgtctcc atcctgaatc ttggacaaaa gagatacacc	1320
aagactactt actggtggga tggcttcaa tcctctgacg attttgcctt gattgtgaat	1380
gcaccaatc atgaagggat tcaagccgga gtcgacaggt tttatcgaa ctgtaagcta	1440
catggaatca atatgagcaa gaaaaagtct tacataaaca gaacaggtag atttgaattc	1500
acaagttttt tctatcgtaa tgggtttgtt gccaatttca gcatggagct tcccagtttt	1560
ggtgtgtctg ggagcaacga gtcagcggac atgagtattg gagttactgt catcaaaaac	1620
aatatgataa acaatgatct tggccagca acagctcaaa tggcccttca gttgttcac	1680
aaagattaca ggtacacgta ccgatgccat agaggtgaca cacaataca aaccgaaga	1740
tcatttgaaa taaagaaact gtgggagcaa acccgttcca aagctggact gctggtctcc	1800
gacggaggcc caaatattata caacattaga aatctccaca ttcctgaagt ctgcctaaaa	1860
tgggaattga tggatgagga ttaccagggg cgtttatgca acccactgaa cccatttgtc	1920
agccataaag aaattgaatc aatgaacaat gcagtgatga tgccagcaca tggccagcc	1980
aaaaacatgg agtatgatgc tgttgcaaca acacactcct ggatcccca aagaaatcga	2040
tccatcttga atacaagtca aagaggagta cttgaagatg aacaaatgta ccaaaggatg	2100
tgcaatttat ttgaaaaatt cttccccagc agttcataca gaagaccagt cgggatatcc	2160
agtatggtgg aggctatggt ttccagagcc cgaattgatg cacggattga tttcgaatct	2220
ggaaggataa agaaagaaga gttcactgag atcatgaaga tctgttccac cattgaagag	2280

ES 2 913 063 T3

ctcagacggc aaaaatagtg aatttagctt gtccttcatg aaaaaatgcc ttgttcctac 2340

t 2341

5
<210> 6
<211> 2341
<212> ADN
<213> Virus de la gripe

<400> 6

ES 2 913 063 T3

agcaaaagca ggcaaaccat ttgaatggat gtcaatccga ctctactggt cctaaagggt	60
ccagcgcaaa atgccataag caccacattc ccttatactg gggatcctcc atacagccat	120
ggaacaggaa cagggtacac catggacaca gtcaacagaa cacaccaata ttcagagaag	180
gggaagtgga cgacaaatac agaaactggg gcacccaac tcaacccaat tgatggacca	240
ctacctgagg ataatgagcc aagtggatat gcacaaacag actgtgtcct ggaggctatg	300
gccttccttg aagaatccca cccaggatatc tttgagaact catgccttga aacaatggaa	360
gtcgttcaac aaacaagggt ggacaaacta actcaaggtc gccagactta tgattggaca	420
ttaaacagaa atcaaccagc agcaactgca ttagccaaca ccatagaagt ttttagatcg	480
aatggactaa cagctaataa atcaggaagg ctaatagatt tcctcaagga tgtgatggaa	540
tcaatggata aagaggaaat ggagataaca acacactttc aaagaaaaag gagagtaaga	600
gacaacatga ccaagaaaat ggtcacacaa agaacaatag ggaagaaaaa acaaagagtg	660
gataagagag gctatctaata aagagctttg acattgaaca cgatgaccaa agatgcagag	720
agaggtaaata taaaaagaag ggctattgca acaccggga tgcaaattag aggggttcgtg	780
tacttcgttg aaactttagc tagaagcatt tgcgaaaagc ttgaacagtc tggactcccg	840
gttgggggta atgaaaagaa ggccaaactg gcaaatgttg tgagaaaaat gatgactaat	900
tcacaagaca ctgagctttc tttcacaatc actggggaca aactaagtg gaatgaaaat	960
caaaaccctc gaatgttttt ggcgatgatt acatatatca caaaaaatca acctgagtgg	1020
ttcagaaaca tcctgagcat cgcaccaata atgttctcaa acaaatggc aagactagga	1080
aaaggataca tgttcgagag taagaggatg aagctccgaa cacaaatacc cgcagaaatg	1140
ctagcaagca ttgacctgaa gtatttcaat gaatcaacaa ggaagaaaat tgagaaaata	1200
aggcctcttc taatagatgg cacagcatca ttgagccctg ggatgatgat gggcatgttc	1260
aacatgctaa gtacggtttt aggagtctcg atactgaatc ttgggcaaaa gaaatacacc	1320
aagacaacat actggtggga tgggctccaa tcctccgacg attttgccct catagtgaat	1380
gcaccaaatac atgagggaat acaagcagga gtggatagat tctacaggac ctgcaagtta	1440
gtgggaatca acatgagcaa aaagaagtcc tatataaata aaacaggagc atttgaattc	1500
acaagctttt tttatcgata tggatttgtg gctaatttta gcatggagct tcccagtttt	1560

ES 2 913 063 T3

ggagtgtctg	gaataaacga	gtcagctgat	atgagcattg	gagtaacagt	gataaagaac	1620
aacatgataa	acaatgacct	tggaccagca	acagcccaga	tggctctcca	attgttcatc	1680
aaagactaca	gatatacata	taggtgccat	agaggagaca	cacaaattca	gacgagaaga	1740
tcattcgagc	taaagaagct	gtgggatcaa	acccaatcaa	gggcaggact	attggtatca	1800
gatgggggac	caaacttata	caatatccgg	aaccttcaca	tccctgaagt	ctgcttaaag	1860
tgggagctaa	tggatgagaa	ttatcaggga	agactttgta	accccctgaa	tccctttgtc	1920
agccataaag	aaattgagtc	tgtaaacaat	gctgtagtga	tgccagccca	tgggtccagcc	1980
aaaagtatgg	aatatgatgc	cgttgcaact	acacactcct	ggattcccaa	gaggaaccgc	2040
tctattctca	acacaagcca	aaggggaatt	cttgaggatg	aacagatgta	ccaaaagtgc	2100
tgcaacttgt	ttgagaaatt	tttccctagt	agttcatata	ggagaccgat	tggaatttct	2160
agcatggtgg	aggccatggt	gtctagggcc	cggattgatg	ccagaattga	cttcgagtct	2220
ggacggatta	agaaggaaga	gttctctgag	atcatgaaga	tctgttccac	cattgaagaa	2280
ctcagacggc	aaaaataatg	aatttagctt	gtccttcatg	aaaaaatgcc	ttgtttctac	2340
t						2341

<210> 7

<211> 2341

<212> ADN

<213> Virus de la gripe

<400> 7

agcaaaagca	ggcaaaccat	ttgaatggat	gtcaatccga	ctctactttt	cctaaagggt	60
ccagcgcaaa	atgccataag	caccacattc	ccctatactg	gagatcctcc	atacagccat	120
ggaacaggaa	caggatacac	catggacaca	gtcaacagaa	cgcaccaata	ttcagaaaaa	180
gggaagtgga	cgacaaacac	agaaactggg	gcaccccaac	tcaacccgat	tgatggacca	240
ctacctgagg	ataatgagcc	aagtggatat	gcacaaacag	actgtgttct	ggaggccatg	300
gctttccttg	aagaatccca	cccagggatc	tttgagaact	catgccttga	aacaatggaa	360
gttgttcagc	aaacaagggg	ggataaacta	actcaaggtc	gccagactta	tgattggaca	420
ttaaacagaa	atcaaccggc	agcaactgca	ttagccaaca	ccatagaagt	ctttagatcg	480
aatggtctaa	cagctaata	gtcaggaagg	ctaatagatt	tcctaaagga	tgtgatggaa	540
tcaatggata	aagaggaaat	agagataaca	acacactttc	aaagaaaaag	gagagtaaga	600
gacaacatga	ccaagaaaaat	ggtcacacaa	agaacaatag	gaaagaaaaa	acaaagagtg	660
aataagagag	gctattttaat	aagagcactg	acattgaata	cgatgaccaa	agatgcagag	720
agaggcaaat	taaaaagaag	ggctattgca	acacccggga	tgcaaatgag	agggttcgtg	780
tactttgttg	aaacttttagc	taggagcatt	tgcgaaaagc	ttgaacagtc	tggacttcca	840

gttgggggta atgaaaagaa ggccaaattg gcaaatgttg tgagaaagat gatgactaat 900
 tcacaagaca cagagctttc tttcacaatc actggggaca acactaagtg gaatgaaaat 960
 caaaatcctc gaatgttcct ggcgatgatt acatatatca caaaaaatca acctgagtgg 1020
 ttcagaaaca tcctgagcat cgcacccata atgttctcaa acaaaatggc aagactagga 1080
 aaaggggtaca tgttcgagag taaaagaatg aagctccgaa cacaaatacc agcagaaatg 1140
 ctagcaagca ttgacctgaa atatttcaat gaatcaacaa ggaagaaaat tgagaaaata 1200
 aggcctcttc taatagatgg cacagcatca ttgagccctg gaatgatgat gggcatgttc 1260
 aacatgctaa gtacggtttt gggagtctcg atactgaatc ttggacaaaa gaaatacacc 1320
 aagacaacat actggtggga tgggctccaa tcctccgacg attttgccct catagtgaat 1380
 gcaccaaatc atgagggaaat acaagcagga gtggatagat tttacaggac ctgcaagtta 1440
 gtgggaatca acatgagcaa aaagaagtcc tatataaata agacagggac atttgaattc 1500
 acaagctttt tttatcgcta tggatttgtg gctaatttta gcatggagct gccagtttt 1560
 ggagtgtctg gaataaatga atcagctgat atgagcattg gagtaacagt gataaagaac 1620
 aacatgataa acaatgacct tggaccagca acagcccaga tggcccttca attgttcatc 1680
 aaagactaca gatatacata tagatgccat agaggagaca cacaaattca gacgagaaga 1740
 tcattcgagc taaagaagct gtgggatcaa acccaatcaa aggcaggact attagtgtca 1800
 gatggaggac caaacttata caatatccg aatcttcaca ttctgaagt ctgcttaaaa 1860
 tgggagctaa tggatgagga ttatcgggga agactttgta atcccctgaa tccctttgtc 1920
 agccataaag agattgagtc tgtaaacaaat gctgtggtga tgccagccca tgggtccagcc 1980
 aaaagcatgg aatatgatgc cgttgcaact acacactcct ggattcccaa gaggaaccgc 2040
 tctatttctca acacaagcca aaggggaatt cttgaggatg aacagatgta ccagaagtgc 2100
 tgcaacctgt tcgagaaatt tttccccagt agttcataca ggagaccggt tggaatttct 2160
 agcatggtgg aggccatggt gtctagggcc cggattgatg ccagaattga cttcgagtct 2220
 ggaaggatta agaaagaaga gttctctgag atcatgaaga tctgttccac cattgaagaa 2280
 ctcagacggc aaaaataatg aatttagctt gtccttcatg aaaaaatgcc ttgtttctac 2340
 t 2341

<210> 8

<211> 2233

<212> ADN

<213> Virus de la gripe

<400> 8

5

10

ES 2 913 063 T3

agcgaaagca ggtactgata caaatggaa gattttgtgc gacaatgctt caatccgatg	60
attgtcgagc ttgcggaaaa aacaatgaaa gagtatgggg aggacctgaa aatcgaaaca	120

ES 2 913 063 T3

aacaaatttg	cagcaatatg	cactcacttg	gaagtatgct	tcatgtattc	agattttcac	180
ttcatcaatg	agcaaggcga	gtcaataatc	gtagaacttg	gtgatccaaa	tgcacttttg	240
aagcacagat	ttgaaataat	cgagggaaga	gatcgacaaa	tggcctggac	agtagtaaac	300
agtatttgca	acactacagg	ggctgagaaa	ccaaagtttc	taccagattt	gtatgattac	360
aaggagaata	gattcatcga	aattggagta	acaaggagag	aagttcacat	atactatctg	420
gaaaaggcca	ataaaattaa	atctgagaaa	acacacatcc	acattttctc	gttcaactggg	480
gaagaaatgg	ccacaaaggc	agactacact	ctcgatgaag	aaagcagggc	taggatcaaa	540
accagactat	tcaccataag	acaagaaatg	gccagcagag	gcctctggga	ttcctttcgt	600
cagtccgaga	gaggagaaga	gacaattgaa	gaaaggtttg	aaatcacagg	aacaatgcgc	660
aagcttgccg	accaaagtct	cccgcogaac	ttctccagcc	ttgaaaattt	tagagcctat	720
gtggatggat	tcgaaccgaa	cggctacatt	gagggcaagc	tgtctcaa	atgtccaaagaa	780
gtaaatgcta	gaattgaacc	ttttttgaaa	acaacaccac	gaccacttag	acttccgaat	840
gggcctccct	gttctcagcg	gtccaaattc	ctgctgatgg	atgccttaaa	attaagcatt	900
gaggacccaa	gtcatgaagg	agagggaata	ccgctatatg	atgcaatcaa	atgcatgaga	960
acattctttg	gatggaagga	acccaatggt	gttaaaccac	acgaaaaggg	aataaatcca	1020
aattatcttc	tgtcatggaa	gcaagtactg	gcagaactgc	aggacattga	gaatgaggag	1080
aaaattccaa	agactaaaaa	tatgaagaaa	acaagtcagc	taaagtgggc	acttggtgag	1140
aacatggcac	cagaaaaggt	agactttgac	gactgtaaag	atgtaggtga	tttgaagcaa	1200
tatgatagtg	atgaaccaga	attgaggtcg	ctagcaagtt	ggattcagaa	tgagtttaac	1260
aaggcatgcg	aactgacaga	ttcaagctgg	atagagctcg	atgagattgg	agaagatgtg	1320
gctccaattg	aacacattgc	aagcatgaga	aggaattatt	tcacatcaga	ggtgtctcac	1380
tgcaagacca	cagaatacat	aatgaagggg	gtgtacatca	atactgcctt	gcttaatgca	1440
tcttgtgcag	caatggatga	tttccaatta	attccaatga	taagcaagtg	tagaactaag	1500
gaggggaaggc	gaaagaccaa	cttgtatggt	ttcatcataa	aaggaagatc	ccacttaagg	1560
aatgacaccg	acgtggtaaa	ctttgtgagc	atggagtttt	ctctcactga	cccaagactt	1620
gaaccacata	aatgggagaa	gtactgtggt	cttgagatag	gagatatgct	tataagaagt	1680
gccataggcc	aggtttcaag	gcccatgttc	ttgtatgtga	gaacaaatgg	aacctcaaaa	1740
attaaaatga	aatggggaat	ggagatgagg	cgttgccctc	tccagtcact	tcaacaaatt	1800
gagagtatga	ttgaagctga	gtcctctgtc	aaagagaaag	acatgaccaa	agagttcttt	1860
gagaacaaat	cagaaacatg	gcccattgga	gagtcacca	aaggagtgga	ggaaagtctc	1920
attgggaagg	tctgcaggac	tttattagca	aagtcggtat	tcaacagctt	gtatgcatct	1980

ccacaactag aaggattttc agctgaatca agaaaactgc ttcttatcgt tcaggctctt 2040
 agggacaacc ttgaacctgg gacctttgat cttggggggc tatatgaagc aattgaggag 2100
 tgcctgatta atgatccctg ggTTTTgctt aatgcttctt ggttcaactc cttccttaca 2160
 catgcattga gttagtgtg gcagtgctac tatttgctat ccatactgtc caaaaaagta 2220
 ccttgtttct act 2233

<210> 9

<211> 2233

<212> ADN

<213> Virus de la gripe

<400> 9

agcaaaagca ggtactgatt cgaaatggaa gattttgtgc gacaatgctt caacccgatg 60
 attgtcgaac ttgcagaaaa aacaatgaaa gagtatggag aggatctgaa aattgaaaca 120
 aacaaatttg cagcaatatg caccacttg gaggtatgtt tcatgtattc agattttcat 180
 ttcatcaatg aacaaggcga atcaataatg gtagaacttg atgatccaaa tgcactgtta 240
 aagcacagat tcgaaataat cgaggggaga gacagaacaa tggcctggac agtagtaaac 300
 agtatctgca aactactgg agctgaaaaa ccgaagtttc taccagattt gtatgattac 360
 aaggagaaca gattcatcga aattggagtg acaagaagag aagtcacat atattacctt 420
 gaaaaggcca ctaaaattaa atctgagaac acacacattc acattttctc attcactggg 480
 gaggaaatgg ccacaaaggc agactacact ctgcacgagg aaagcagggc taggattaaa 540
 accaggctat ttaccataag acaagaaatg gccaacagag gcctctggga ttcctttcgt 600
 cagtccgaaa gaggcgaaga aacaattgaa gaaaaatttg aaatctcagg aactatgcgt 660
 aggcttgccg accaaagtct cccaccgaac ttctcctgcc ttgagaattt tagagcctat 720
 gtggatggat tcgaaccgaa cggctgcatt gagggcaagc tttctcaaat gtccaaagaa 780
 gtgaatgcca aaattgaacc ttttctgaag acaacaccaa gaccaatcaa acttcctaatt 840
 ggacctcctt gttatcagcg gtccaaattc ctctgatgg atgctttgaa attgagcatt 900
 gaagacccaa gtcacgaagg agaagggatt ccattatatg atgcgatcaa gtgcataaaa 960
 acattctttg gatggaaaga accttatata gtcaaaccac acgaaaaggg aataaattca 1020
 aattacctgc tgtcatggaa gcaagtattg tcagaattgc aggacattga aatgaggag 1080
 aagatcccaa ggactaaaaa catgaagaaa acgagtcaac taaagtgggc tcttggtgaa 1140
 aacatggcac cagagaaagt agactttgac aactgcagag acataagcga tttgaagcaa 1200
 tatgatagtg acgaacctga attaagggtca ctttcaagct ggatacagaa tgagttcaac 1260
 aaggcctgcg agctaactga ttcaatctgg atagagctcg atgaaattgg agaggacgta 1320
 gccccaattg agtacattgc aagcatgagg aggaattatt tcacagcaga ggtgtcccat 1380

ES 2 913 063 T3

tgtagagcca ctgagtacat aatgaagggg gtatacatta atactgccct gctcaatgca	1440
tcctgtgcag caatggacga ttttcaatta atcccatga taagcaagtg cagaactaaa	1500
gaggaagggc gaaaaaccaa tttatatgga ttcatacataa aggaagatc tcatttaagg	1560
aatgacacag atgtggtaaa ctttgtgagc atggaatttt ctctcactga cccgagacta	1620
gagccacata aatgggagaa atactgtgtc cttgagatag gagatatgtt actaagaagt	1680
gccataggcc aaatttcaag gcctatgttc ttgtatgtta ggacaaacgg aacatcaaag	1740
gtcaaaatga aatggggaat ggagatgaga cgttgccctcc ttcagtcact ccagcagatc	1800
gagagcatga ttgaagccga gtcctcgatt aaagagaaag acatgaccaa agagtttttt	1860
gagaataaat cagaagcgtg gccattggg gagtcccca agggagtggg agaaggttcc	1920
attgggaaag tctgtaggac tctattggct aagtcagtgt tcaatagcct gtatgcatca	1980
ccacaattgg aaggattttc agcggagtca agaaaactgc ttcttgttgt tcaggctctt	2040
agggacaacc tcgaacctgg gacctttgat ctcggggggc tatatgaagc aattgaggag	2100
tgctgatta atgatccctg ggttttgctc aatgcatctt ggttcaactc cttcctgaca	2160
catgcattaa aatagttatg gcagtgtac tatttggtat ccgtactgtc caaaaaagta	2220
ccttgtttct act	2233

<210> 10

<211> 2233

<212> ADN

<213> Virus de la gripe

<400> 10

agcaaaagca ggtactgatt cgaaatggaa gattttgtgc gacaatgctt caacccgatg	60
attgtcgaac ttgcagaaaa ggcaatgaaa gagtatggag aggatctgaa aattgaaaca	120
aacaaatttg cagcaatatg cactcacttg gaggtatggt tcatgtattc agattttcat	180
ttcatcaatg aacaaggtga atcaatagtg gtagaacttg acgatccaaa tgcactgtta	240
aagcacagat ttgaaataat agagggggaga gacagaacga tggcctggac agtagtaaac	300
agtatctgca acactactgg agctgagaaa ccgaagtttc tgccagattt gtatgattac	360
aaggagaaca gattcatcga aattggagta acaaggagag aagtccacat atattacctt	420
gaaaaggcca ataaaattaa atctgagaat acacacatcc acattttctc attcactggg	480
gaggaaatgg ccacaaaggc agactacact ctcgacgagg aaagcagggc taggattaag	540
accaggctat ttaccataag acaagaaatg gccaacagag gcctctggga ttcctttcgt	600
cagtccgaaa gaggcgaaga gacaattgaa gaaaaatttg aaatctcagg aactatgcgc	660
aggcttgccg accaaagcct cccgccgaac ttctcctgcc ttgagaattt tagagcctat	720
gtagatggat tcgaaccgaa cggctgcatt gagggcaagc tttctcaaat gtccaaagaa	780

gtgaatgccaa aaattgaacc ttttctgaag acaacaccaa gaccaatcaa acttccgaat 840
 ggacctcctt gttatcagcg gtccaaattc cttctgatgg atgctttaaa attaagcatt 900
 gaagacccaa gtcatgaagg agaaggata ccactatatg atgcatcaa gtgcataaga 960
 acattctttg gatggaaaga accctatata gtcaaaccac acgaaaaggg aataaattca 1020
 aattacctgc tgtcatggaa gcaagtactg gcagaattgc aggacattga aactgaggag 1080
 aagattccaa gaactaaaaa catgaagaaa acgagtcaac taaagtgggc tcttgggtgaa 1140
 aacatggcac cagagaaagt agactttgac aactgcagag acataagcga tttgaagcaa 1200
 tatgatagtg acgaacctga attgaggtca ctttcaagct ggatacagaa tgagttcaac 1260
 aaggcatgcg agctgactga ttcaatctgg atagagctcg atgaaattgg agaagacata 1320
 gcccgaattg agtacattgc aagcatgagg aggaattatt tcacagcaga ggtgtccac 1380
 tgcagagcca ctgagtacat aatgaagggg gtatacatta atactgcctt gctcaatgca 1440
 tcctgtgcag caatggacga ttttcaacta attcccatga taagcaagtg cagaacaaaa 1500
 gaggggaaggc gaaaaaccaa tttatatgga ttcatacataa aaggagagatc tactttaagg 1560
 aatgacacag atgtggtaaa ctttgtgagc atggagtttt ctctcactga cccgaggctt 1620
 gagccacata aatgggagaa atactgtgtc cttgagatag gagatatgtt actaagaagt 1680
 gccataggcc aaatgtcaag gcctatgttc ttgtatgtga ggacaaatgg aacatcaaag 1740
 atcaaaatga aatggggaat ggagatgaga cgttgcctcc ttcagtcact ccagcagatc 1800
 gagagcatga ttgaagccga gtcctcgggt aaagagaaag acatgaccaa agagtttttt 1860
 gagaataaat cagaagcatg gccattggg gagtcccca agggagtggg agaaggttcc 1920
 attgggaaag tttgtaggac tttgttggct aagtcggtgt tcaatagcct gtatgcatct 1980
 ccacaattag aaggattttc agcggagtca agaaaactgc tccttgttgt tcaggctctt 2040
 agggacaacc ttgaacctgg gacctttgat cttggggggc tatatgaagc aattgaggag 2100
 tgcctgatta atgatccctg ggttttgctc aatgcgtctt ggttcaactc cttcctgaaa 2160
 catgcattaa aatagttatg gcagtgtac tatttgttat ccatactgtc caaaaaagta 2220
 ccttgtttct act 2233

<210> 11
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

<400> 11
 atggtctcta ctgatggtga gcaagggcga g

31

<210> 12

ES 2 913 063 T3

	<211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> Cebador	
	<400> 12 atgaagacaa tctcttactt gtacagctcg tcca	34
10	<210> 13 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Cebador	
20	<400> 13 ggacacgctg aactgtgg	19
	<210> 14 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Cebador	
30	<400> 14 agataagagg ataatggaaa tg	22
	<210> 15 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Cebador	
40	<400> 15 atatgtcca ckggtgtttt tg	22
45	<210> 16 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Cebador	
	<400> 16 ggagaagact gaggggattc	20
55	<210> 17 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Cebador	
	<400> 17 tccatggtgt atcctgttcc	20
65	<210> 18	

ES 2 913 063 T3

	<211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> Cebador	
10	<400> 18 tgatttcgaa tctggaagga	20
15	<210> 19 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador	
25	<400> 19 tgagtgcata ttgctgcaaa t	21
30	<210> 20 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Cebador	
40	<400> 20 ttcttatcgt tcaggctctt	20
45	<210> 21 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Cebador	
55	<400> 21 tccagtatgg tttgayttc cr	22
60	<210> 22 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Cebador	
	<400> 22 tggactagtg sgagcatsat	20
	<210> 23 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador	
	<400> 23 tcccaggcgg tctcccatcc	20
	<210> 24	

<211> 395
 <212> ARN
 <213> Virus de la gripe

5 <400> 24

```

agcgaaagca ggucaaaauau auucaauaug gaaagaauaa aagaacuaag aaaucaauug      60
ucgcagucuc gcacccgcga gauacucaca aaaaccaccg uggaccauau ggccauaauc      120
aagaaguaca caucaggaag acaggagaag acugagggga uuccucauuc ugggcaaaga      180
ggacaagaga uaugggccag cacuaagcau caaugaacug agcaaccuug cgaaaggaga      240
gaaggcuaau gugcuaauug ggcaagggga ugugguguug guaaugaaac ggaaacggga      300
cucuagcaua cuuacugaca gccagacagc gaccaaaga auucggaug ccaucaauua      360
gugucgaaua guuuaaaaac gaccuuguuu cuacu                                     395
    
```

10 <210> 25
 <211> 62
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe

15 <400> 25

```

Met Glu Arg Ile Lys Glu Leu Arg Asn Leu Met Ser Gln Ser Arg Thr
1           5           10           15

Arg Glu Ile Leu Thr Lys Thr Thr Val Asp His Met Ala Ile Ile Lys
          20           25           30

Lys Tyr Thr Ser Gly Arg Gln Glu Lys Thr Glu Gly Ile Pro His Ser
          35           40           45

Gly Gln Arg Gly Gln Glu Ile Trp Ala Ser Thr Lys His Gln
          50           55           60
    
```

REIVINDICACIONES

1. Un virus de la gripe A de interferencia defectuoso clonado o recombinante para su uso en un método de tratamiento o profilaxis de infecciones por virus respiratorios,

5 en donde el virus de la gripe A de interferencia defectuoso clonado o recombinante comprende ARN derivado del segmento 1, 2 o 3,
 en donde dicho ARN comprende:

- 10 (a) un ARN de entre 300 y 600 nucleótidos de longitud;
 (b) al menos 100 nucleótidos de los extremos 5' y 3' del segmento 1, 2 o 3; y
 (c) una delección central de nucleótidos de dicho segmento;

15 en donde dicho virus de la gripe de interferencia defectuoso es capaz de interferir con la producción de ARN de los segmentos 1, 2 y 3 de la gripe A y
 en donde dicho virus de la gripe de interferencia defectuoso no es 1/244.

2. Un virus de interferencia defectuoso para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la infección por virus respiratorio es infección por gripe A.

Figura 1

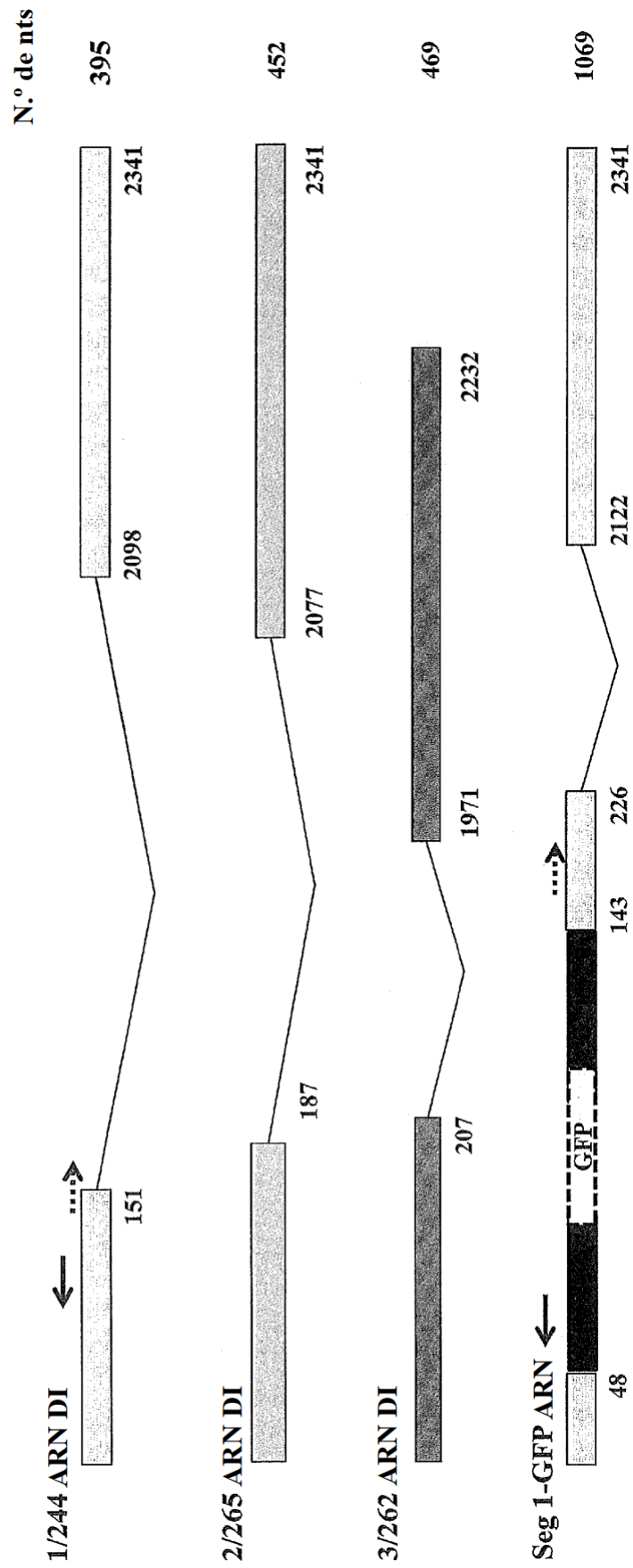
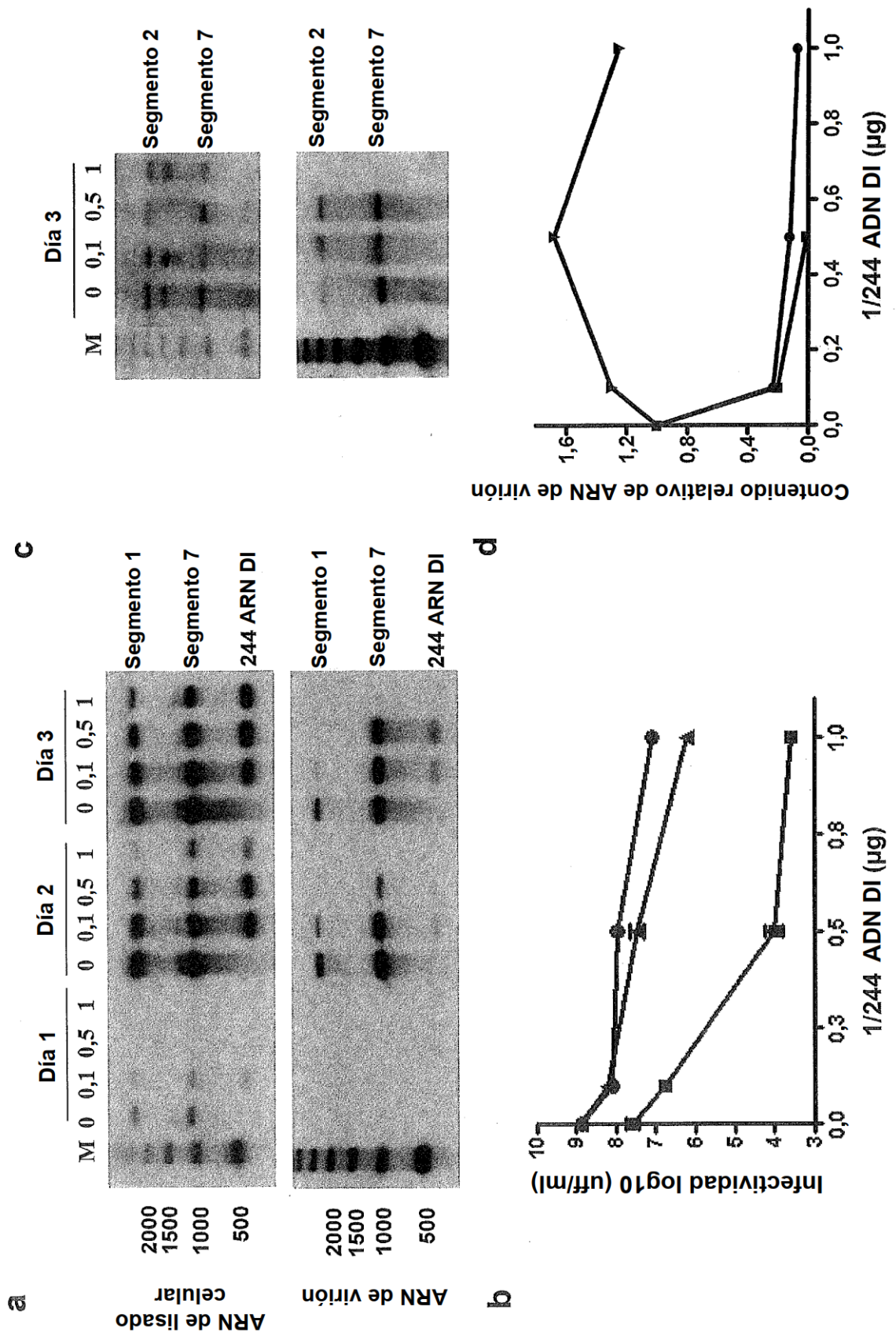


Figura 2



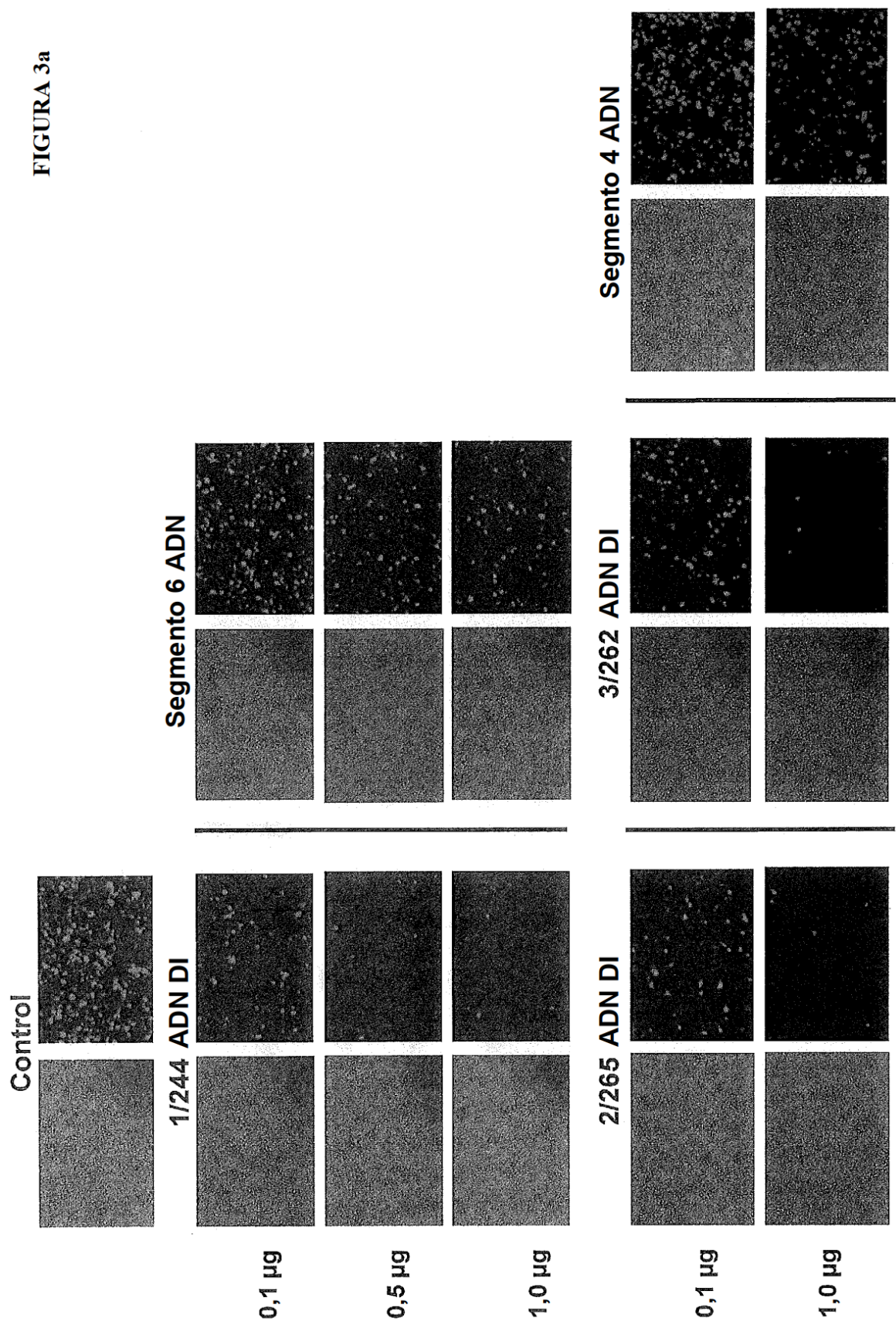


FIGURA 3b

b

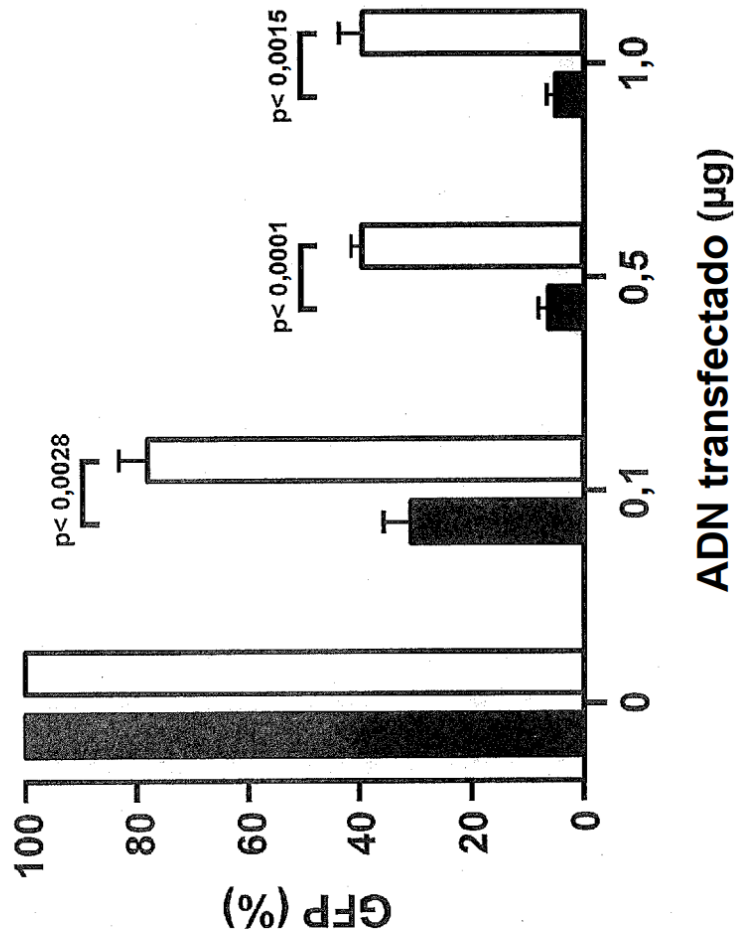


FIGURA 4

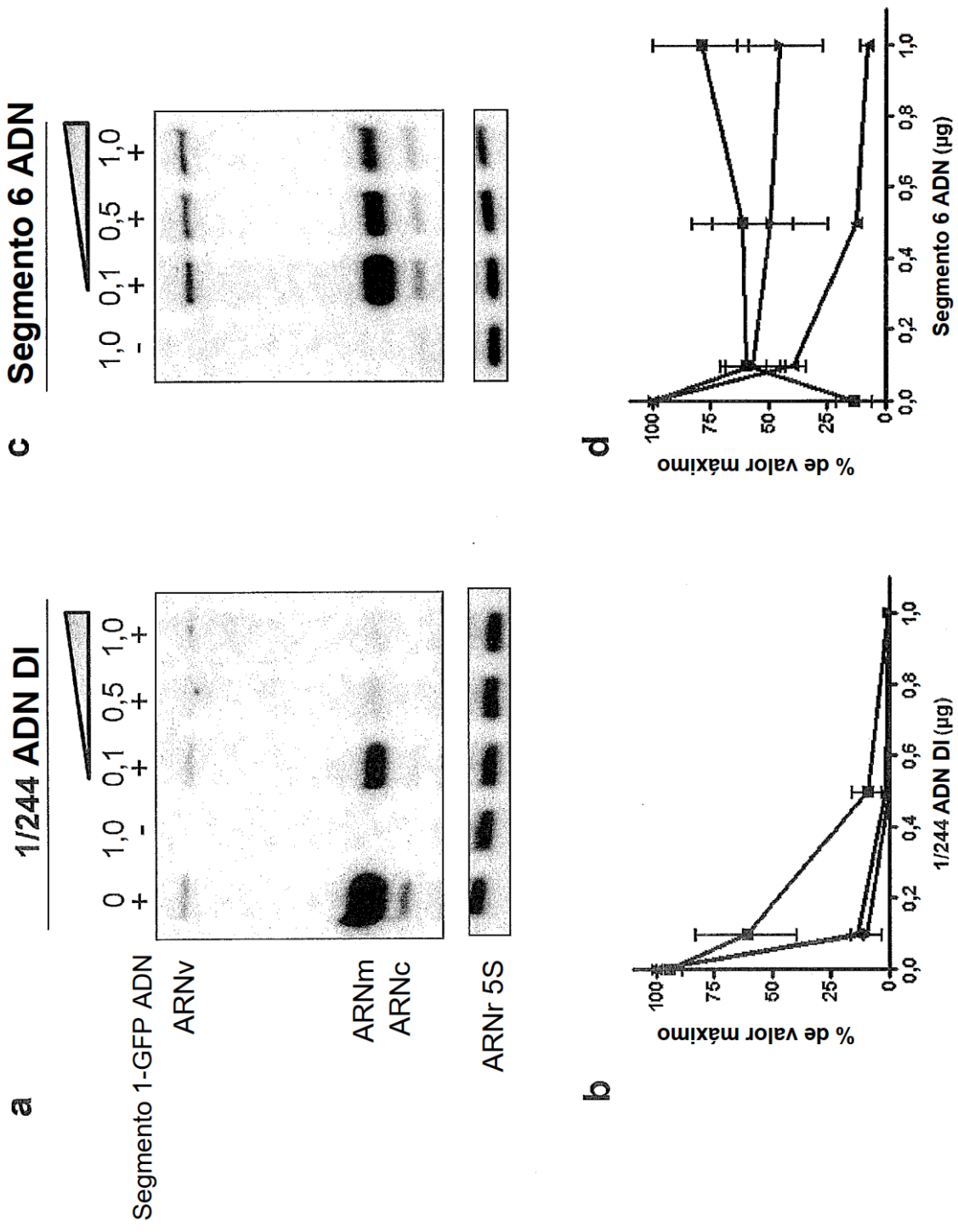


FIGURA 5

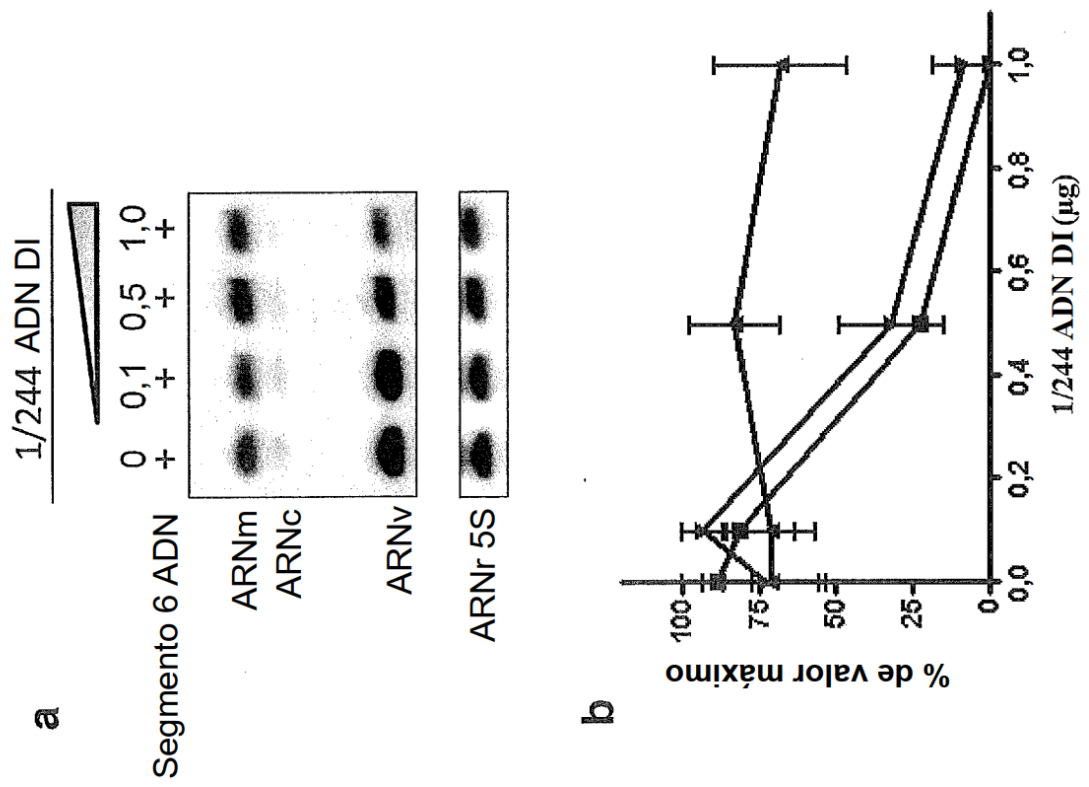


FIGURA 6

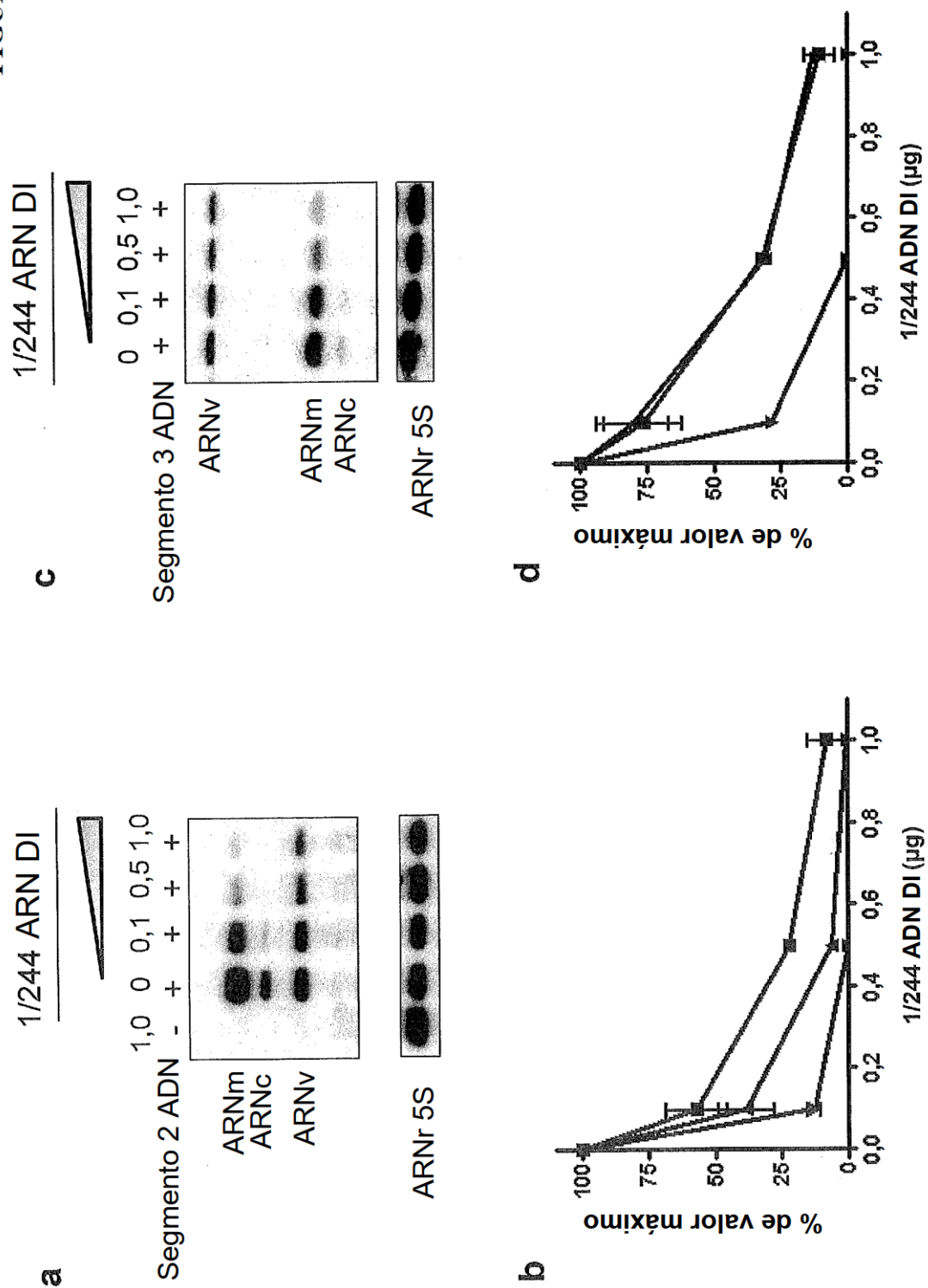


FIGURA 7

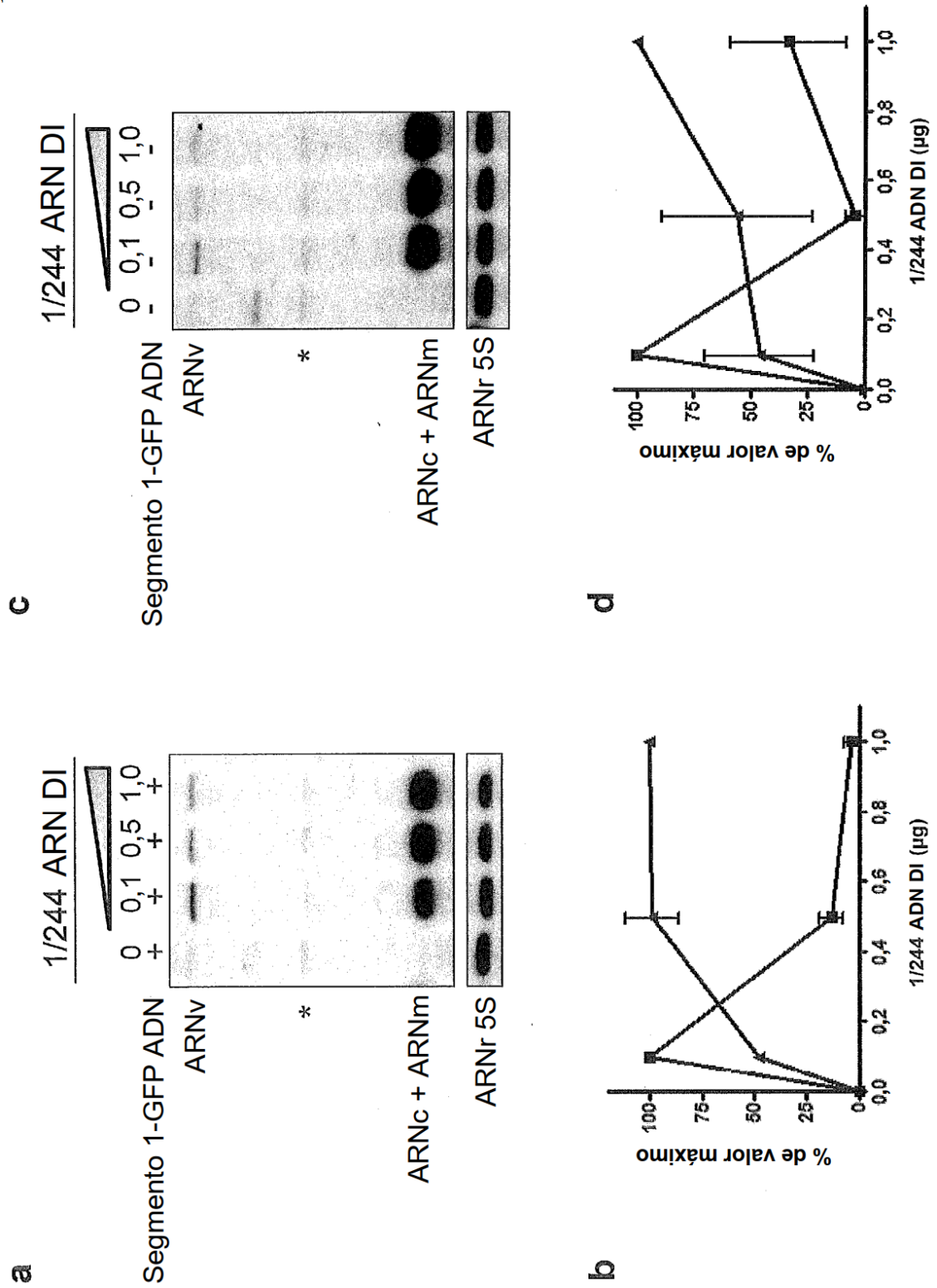


FIGURA 8

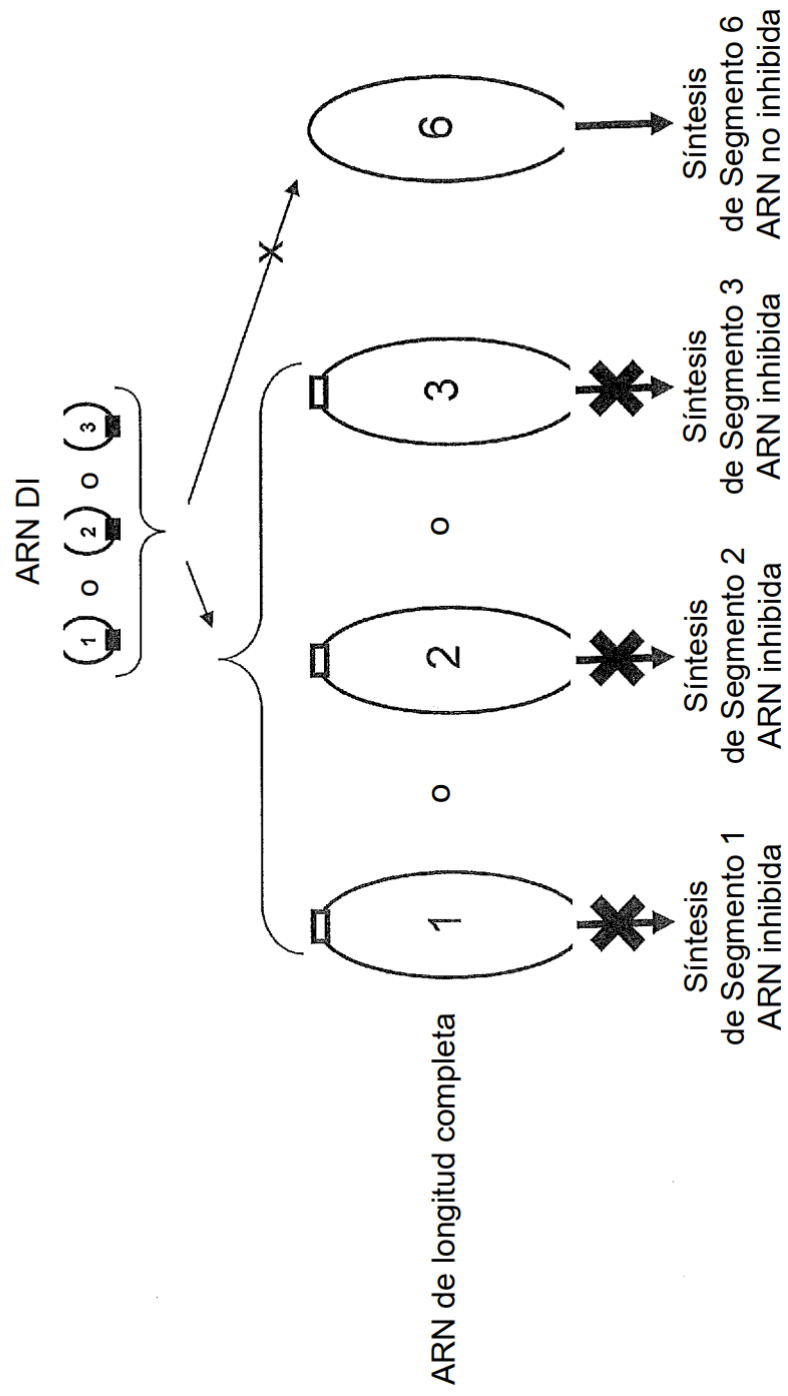


FIGURA 9

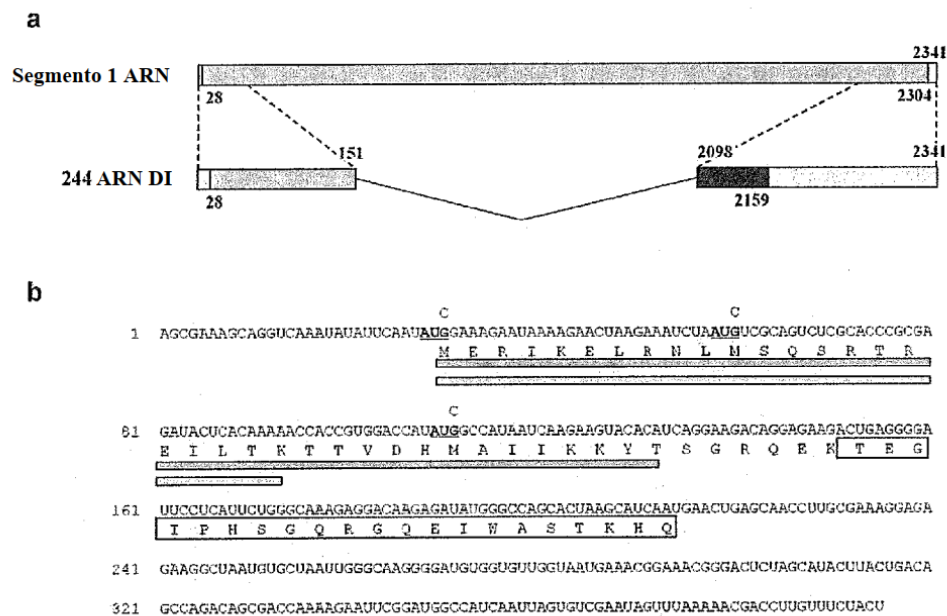


FIGURA 10

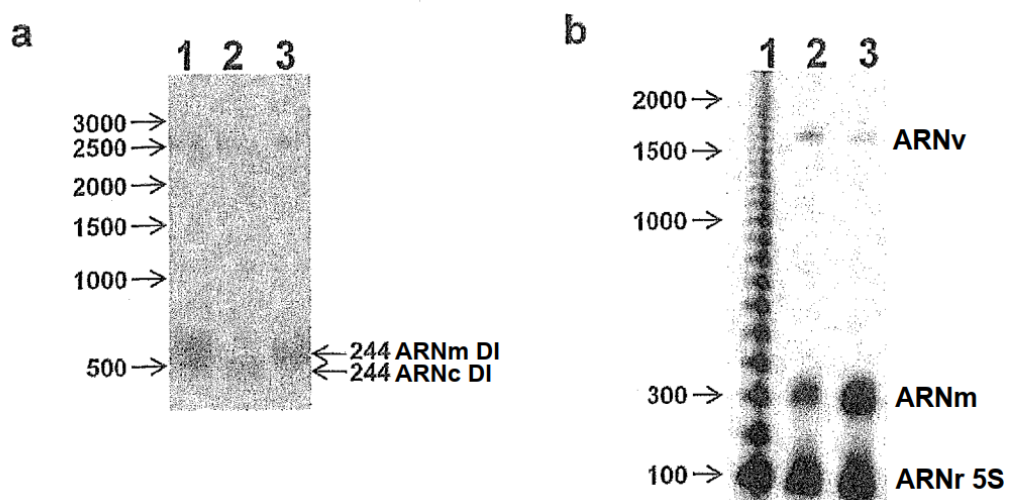
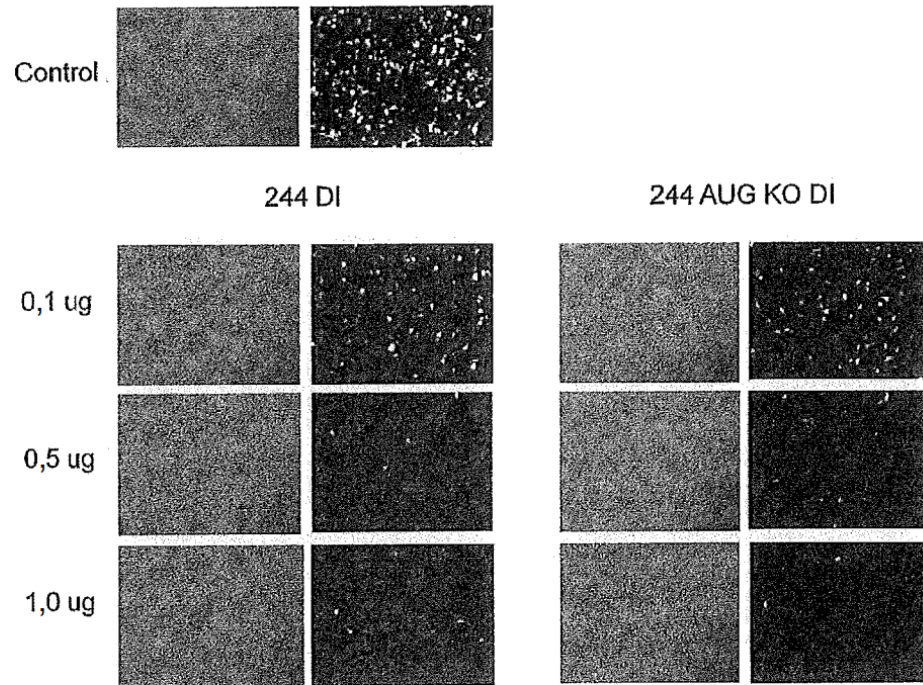


FIGURA 11

A.



B.

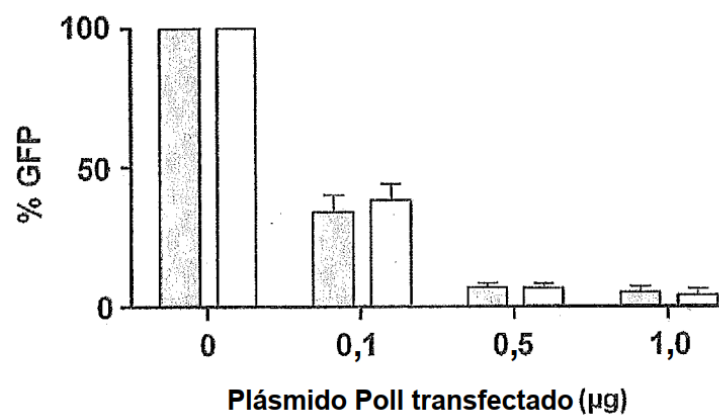


FIGURA 12

