

(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.

15 Durante el transcurso de la replicación vírica, pueden generarse genomas de progenie que contienen delecciones 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 20 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.

25 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 delección 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 30 infecciosos.

35 La replicación del genoma del virus de la gripe comienza con la síntesis de copias de sentido positivo (ARNr) 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 ARNr, 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 ARNr 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'.

40 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 ARNr fuertemente asociado con la nucleoproteína (NP) del virus. La ARN polimerasa vírica comprende un heterotímero de proteínas PB1, PB2 y PA, que están codificadas por los segmentos 2, 1 y 3 del ARNv, respectivamente.

45 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 delección 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.

55 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 interfiere 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 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.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

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 transfecaron 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 extraío 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 transfecaron 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 transcrita 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 transcrita 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 transcrita 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 en 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 transcrita 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 transcrita del segmento 1 del genoma. El carril 1 contiene ARN celular total. El carril 2 contiene ARN no poliadénilado. El carril 3 contiene ARNm poliadénilado. 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 poliacrilamida 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 transfecionaron 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 transfecionaron con un vector DI vacío (1 µg). (b) Cuantificación de la fluorescencia generada en células en presencia de plásmidos transfecidos 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.

45 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 50 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 55 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 permite 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 60 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 transfecia 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.

5 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 10 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. 15 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 20 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.

25 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 30 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.

35 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.

40 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 45 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.

50 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 55 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 60 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.

65 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 10 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 15 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 20 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 25 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 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 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 delecciones 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

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 ejemplo, vías oral, intravenosa, cutánea o subcutánea, nasal, intramuscular, intraperitoneal.
- 15 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.
- 20
- 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 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.
- 35
- 40 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 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 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.
- 50
- 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 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 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.
- 60
- 65

- 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 10 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 15 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 25 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 30 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.
- 35 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 40 100 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.
- 45 50 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.
- 55 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.
- 60 65 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.
- 5 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.
- 10 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.
- 15 Normalmente, el individuo es un ser humano. El sujeto es normalmente un paciente, pero también puede ser un individuo en riesgo de infección.
- 20 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 25 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 30 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 35 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 40 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.
- 45 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 50 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.
- 55 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 60 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.
- 65 El virus DI de este aspecto de la divulgación puede formularse en composiciones farmacéuticas. Estas composiciones

5 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.

10 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, 15 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.

20 15 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.

25 Ejemplos

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

25 Materiales y métodos

Plásmidos

30 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'ATGGTCTACTGATGGTGAGCAAGGGCGAG y 5'ATGAAGACAATCTCTTACTTGTACAGCTCGTCCA. El producto se insertó entre los sitios *Bpi*I and *Eco*31/ 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) 35 (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 40 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

50 45 Se transfecieron 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 transfeció 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 transfecadas se incubaron después a 37 °C durante la noche antes de cocultivar con células MDCK en un 55 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 transfeció con 1 µg de cada uno de los plásmidos de expresión de ADNc PB2, PB1, PA y NP 60 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

65 65 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 %. Despues 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.

10 *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	GGACACGCTGAACTTGTGG
	ARNv	AGATAAGAGGATAATGGAAATG
DI 1/244	ARNc/m	ATATGGTCCACKGTGGTTTG
	ARNv	GGAGAAGACTGAGGGGATTG
Segmento 2 (PB1)	ARNc/m*	TCCATGGTGTATCCTGTTCC
	ARNv*	TGATTCGAATCTGGAAGGA
Segmento 3 (PA)	ARNc/m*	TGAGTGCATATTGCTGCAAAT
	ARNv*	TTCTTATCGTTCAGGCTCTT
Segmento 6 (NA)	ARNc/m*	TCCAGTATGGTTTGAYTTCCR
	ARNv*	TGGACTAGTGSAGCATSAT
ARNr 5S*		TCCCAGGCCGTCTCCCATCC

25

Transferencia Northern

Para la electroforesis en gel de gioxalagarosa 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 marcados 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 de rayos 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

40 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.

50

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

- 5 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
- 10 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 transfeció 1 µg de plásmido 1/244 (Fig. 2a, panel inferior).
- 15 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
- 20 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

- 25 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
- 30 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 transfecaron 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
- 35 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.
- 40
- 45

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

- 50 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.
- 55
- 60
- 65

- Para controlar la especificidad de acción del ARN inhibidor, los presentes inventores transfecaron 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 transfecado (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 transfecaron 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 transfecado. 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 una 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 antivíricos 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 (Akkina *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 transfecaron células 293T humanas con plásmidos como se describió anteriormente (Dimmock *et al.* 2008). Brevemente, se transfecaron 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 transfecadas 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 alantoides 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 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 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 glicoxal-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 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).

30 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 2× 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.

40 Interferencia medida por la inhibición de GFP

- 40 Las células 293T se transfecaron 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 transfecadas con diferentes niveles de los plásmidos indicadores. Se calculó una media para dar el porcentaje del área positiva de GFP por monocapa.

Protección de ratones contra la gripe con virus DI

- 55 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 transcrita 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.

30 244 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 cotransfектados 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).

50 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 afin 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 poliadénilado (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).

25 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 30 mutación no tuvo efecto sobre la interferencia *in vitro* y la protección *in vivo* por 244 ARN DI.

35 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

40 <120> ENSAYO Y MEDICAMENTO

<130> N401234WO

<150> GB1400752.0

45 <151> 16/01/2014

<160> 25

<170> PatentIn versión 3.5

50 <210> 1

<211> 395

<212> ADN

<213> Virus de la gripe

55 <400> 1

ES 2 913 063 T3

agcgaaagca ggtcaaataat attcaatataatg gaaaagaataa aagaactaag aaatctaattg	60
tcgcagtctc gcaccccgcgaa gatactcaca aaaaccacccg tggaccatataatg ggcataatc	120
aagaagtaca catcaggaag acaggagaag actgagggga ttccctcatttcc tgggcaaaga	180
ggacaagaga tatgggccag cactaaggcat caatgaactg agcaaccccttg cgaaaggaga	240
gaaggctaat gtgctaatttgg ggcaagggga tgtggtgttgg gtaatgaaac ggaaacggga	300
ctcttagcata cttaactgaca gccagacagc gaccaaaaaga attcggatgg ccatcaatttta	360
gtgtcgaaaaata gttaaaaac gaccccttttctact	395

<210> 2

<211> 2341

<212> ADN

<213> Virus de la gripe

<400> 2

agcgaaaagca ggtcaattat attcaatatg gaaagaataa aagaactaag aaatctaatt	60
tcgcagtctc gcacccgcga gatactcaca aaaaccacccg tggaccatat ggccataatc	120
aagaagtaca catcaggaag acaggagaag aacctcgcac ttaggatgaa atggatgatg	180
gcaatgaaat atccaattac agcagacaag aggataacgg aaatgattcc tgagagaaat	240
gagcaaggac aaactttatg gagtaaaatg aatgatgccg gatcagacccg agtgatggta	300
tcacctctgg ctgtgacatg gtggaatagg aatggaccaa tgacaaatac agttcattat	360
ccaaaaatct acaaaactta ttttggaaaga gtcgaaaggc taaagcatgg aacctttggc	420
cctgtccatt ttagaaacca agtcaaaata cgtcggagag ttgacataaaa tcctggtcatt	480
gcagatctca gtgccaagga ggcacaggat gtaatcatgg aagttgttt ccctaacgaa	540
gtgggagcca ggatactaac atcggaatcg caactaacga taacccaaaga gaagaaaagaa	600
gaactccagg attqcaaaat ttctccttq atqggttgcatt acatqtttgg aqagaaactg	660

ES 2 913 063 T3

gtccgc	aaaa	cgagattcct	cccagtggct	ggtggAACAA	gcagtgtgtA	cattgaagtG	720
ttgcattgA	ctcaaggaAC	atgctggAA	cagatgtataC	ctccaggAGG	ggaagtGAAG		780
aatgatgatG	ttgatcaaAG	cttgattattT	gctgcttagGA	acatagtGAG	aagagctGCA		840
gtatcagcagG	accactAGC	atcttattG	gagatgtGCC	acagcacacaG	attgggtGGA		900
attaggatggA	tagacatcCT	taagcagaAC	ccaacagaAG	agcaaggCGT	gggttatATG		960
aaggctgcaaT	tgggactGAG	aattagctCA	tccttcagTT	ttggtgGATT	cacatttaAG		1020
agaacaagCG	gatcatcaGT	caagagAGAG	gaagaggTGC	ttacgggCAA	tcttcaaACA		1080
ttgaagataaG	gagtgcATGA	gggatatGAA	gagttcacAA	tggttggGAG	aagagcaACA		1140
gccatactcaG	aaaagcaAC	caggagattG	attcagctGA	tagtgagtGG	gagagacGAA		1200
cagtcgattG	ccgaagcaAT	aattgtggCC	atggtatTTT	cacaagAGGA	ttgtatGATA		1260
aaagcagttaG	gaggtgatCT	gaatttcgtC	aatagggcGA	atcagcgACT	gaatcctATG		1320
catcaactttT	taagacattT	tcagaaggAT	gcgaaagtGC	ttttcaAAA	ttggggagTT		1380
gaacctatcgA	acaatgtGAT	gggaatgATT	gggatattGC	ccgacatGAC	tccaagcATC		1440
gagatgtcaaG	tgagaggAGT	gagaatcAGC	aaaatggGTG	tagatgAGTA	ctccagcACG		1500
gagagggtagT	tggtgagCAT	tgaccggTT	ttgagagtCC	gggaccaACG	aggaaatGTA		1560
ctactgtctC	ccgaggaggT	cagtgaaACA	cagggAACAG	agaaaACTGAC	aataacttAC		1620
tcatcgtaaG	tgatgtggGA	gattaatGGT	cctgaatCAG	tgttgtCAA	tacctatCAA		1680
tggatcatcaG	gaaactggGA	aactgttaAA	attcagtGgt	cccagaACCC	tacaatGCTA		1740
tacaataaaaT	tggaatttGA	accatttcAG	tctttagTAC	ctaaggccAT	tagaggccAA		1800
tacagtgggtT	ttgtgagaAC	tctgttccAA	caaatgAGGG	atgtgcttGG	gacatttgAT		1860
accgcacagaT	taataaaaACT	tcttccctTC	gcagccgCTC	caccaaaAGCA	aagtagaaATG		1920
cagttctctC	catttactGT	gaatgtgAGG	ggatcaggAA	tgagaataCT	tgttaaggGGC		1980
aattctccTG	tattcaactA	caacaaggCC	acgaagAGAC	tcacagttCT	cgaaaaggAT		2040
gctggcacttT	taaccgaAGA	cccagatGAA	ggcacagCTG	gagtggagTC	cgctgttCTG		2100
aggggattccC	tcattctGGG	caaagaAGAC	aggagatATG	ggccagcATT	aagcatcaAT		2160
gaactgagcaA	accttgcGAA	aggagagaAG	gctaatgtGC	taattggGCA	aggagacGTG		2220
gtgttgttAA	tgaaacgAAA	acgggactCT	agcatactTA	ctgacagCCA	gacagcgACC		2280
aaaagaattcT	ggatggccAT	caattagtGT	cgaatagTTT	aaaaacgACC	ttgtttctAC		2340
							2341
	t						

<210> 3

<211> 2341

<212> ADN

<213> Virus de la gripe

5

<400> 3

ES 2 913 063 T3

agcaaaagca ggtcaattat attcagtatg gaaaagaataa aagaactacg gaatctgatg	60
tcgcagtctc gcactcgca gatactgaca aaaaccacag tggaccatat gccataatt	120
aaaaagtaca catcgggag acaggaaaag aacccgtcac ttaggatgaa atggatgatg	180
gcaatgaaat acccaatcac tgctgacaaa aggataacag aaatggtcc ggagagaaat	240
gaacaaggac aaactctatg gagtaaaatg agtgatgctg gatcagatcg agtcatggta	300
tcaccttgg ctgtaacatg gtgaaataga aatggacccg tgacaagtac ggtccattac	360
ccaaaagtat acaagactta tttgacaaa gtcgaaaggt taaaacatgg aacctttggc	420
cctgttcatt ttagaaatca agtcaagata cgcagaagag tagacataaa ccctggtcat	480
gcagacctca gtgccaaaga ggcacaagat gtaattatgg aagtttttt tcccaatgaa	540
gtgggagcca ggatactaac atcagaatcg caattaacaa taactaaaga gaaaaaagaa	600
gaactccgag attgcaaaat ttctcccttg atgggtgcacatgttgc gagagaactt	660
gtacggaaaa caagattct cccagttgct ggcggacaa gcagtatata cattgaagtt	720
ttacatttga ctcaaggaac gtgttggaa caaatgtaca ctccaggtgg agaagtgagg	780
aatgacgata ttgaccaaag cctaattatt gcggccagga acatgtaag aagagccgca	840
gtatcagcag atccactagc atcttatttgc gagatgtgcc acagcacaca aattggcggg	900
acaaggatgg tggacattct tagacagaac ccaactgaag aacaagctgt ggatatatgc	960
aaggctgcaa tgggatttgc aatcagctca tccttcagct ttgggtggtt tacatttaaa	1020
agaacaagcg ggtcatcgt caaaaaagag gaagaagtgc ttacaggcaa tctccaaaca	1080
ttgaagataa gagtacatga ggggtatgag gagttcacaa tggtgggaa aagagcaaca	1140
gctataactaa gaaaagcaac cagaagatttgc gttcagctca tagtgcgtgg aagagacgaa	1200
cagtcaatag ccgaagcaat aatcgtggcc atgggtttt cacaagagga ttgcgttata	1260
aaagcagttt gaggtgaccc gaatttcgtc aacagagcaa atcagcggtt gaacccatg	1320
catcagcttt taaggcattt tcagaaagat gcgaaagtgc ttttcaaaa ttggggattt	1380
gaacacatcg acagtgttatg gggatgatt ggagtattac cagatatgac tccaagcaca	1440
gagatgtcaa tgagaggaat aagagtcagc aaaatgggtg tggatgaaata ctccagttaca	1500
gagaggggtgg tggtagcat tgatcggtt ttgagagttc gagaccaacg tggatgtat	1560
ttattatctc ctgaggaggt cagtgaacaca cagggactg agagactgac aataacttat	1620
tcatcgtcga tgatgtggaa gattaacggc cctgagtcgg tttggtaaa tacctatcaa	1680
tggatcatca gaaattggaa agctgtcaaa attcaatggt ctcagaatcc tgcaatgttgc	1740
tacaacaaaa tggaaatttgc accatttcaa tcatttgc ccaaggccat tagaagccaa	1800

ES 2 913 063 T3

tacagtgggt ttgtcagaac tctattccaa caaatgagag acgtacttgg gacatggac	1860
accaccaga taataaagct tctcccttt gcagccgctc caccaagca aagcagaatg	1920
cagttctctt cactgactgt aaatgtgagg ggatcaggga tgagaatact tgtaagggc	1980
aattctcctg tattcaacta caacaagacc actaaaagac taacaattct cgaaaaagat	2040
gccggcactt taattgaaga cccagatgaa agcacatccg gagtggagtc cgccgtcttgc	2100
agagggtttc tcattatagg taaggaagac agaagatacg gaccagcatt aagcatcaat	2160
gaactgagta accttgcaaa agggaaaag gctaatgtgc taatcggca aggagacgtg	2220
gtgttggtaa tgaaacgaaa acgggactct agcatactta ctgacagcca gacagcgacc	2280
aaaagaattc ggatggccat caattaatgt tgaatagttt aaaaacgacc ttgtttctac	2340
t	2341

5 <210> 4
 <211> 2341
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

<400> 4	
agcaaaaagca ggtcaattat attcagtatg gaaagaataa aagaactacg gaacctgatg	60
tcgcagtctc gcactcgca gatactaaca aaaaccacag tggaccatat gccataatt	120
aagaagtaca catcagggag acagggaaaag aacccgtcac ttaggatgaa atggatgatg	180
gcaatgaaat atccaatcac tgctgacaaa aggataacag aaatggttcc ggagagaaaat	240
gaacaaggac aaactctatg gagtaaaatg agtgatgctg ggtcagatcg agtgatggta	300
tcaccttgg ctgtgacatg gtggataga aatggacctg tgacaaatac ggttcactat	360
ccaaaagtat acaagactta tttgacaaa gtcgaaaggt taaaacatgg aaccttggc	420
cctgttcatt ttagaaatca agtcaagata cgccgaagag tggacataaa ccctggcat	480
gcagacctca gtgccaagga ggcacaagat gtaattatgg aagttttt ccccaatgaa	540
gtgggagcca ggatactaac atcagaatca caattaacaa taaccaaaga gaaaaaaagaa	600
gaactccgag attgcaaaat ttctcccttg atggttgcat acatttttaga gaggaaactt	660
gtccgaaaaa cgagattct cccagttgtc ggccgaacaa gcagtatata cattgaagtt	720
ttacattga ctcaaggaac gtgttggaa caaatgtaca ctccaggtgg agaagtgagg	780
aatgacgatg ttgaccaaag cctaattatt gcagccagga acatagttag aagagccgca	840
gtatcagcag atccactagc atcttattt gагатgtgcc acagcacaca aattggcggg	900
acaaggatgg tggacattct taggcagaac ccgacggaag aacaagctgt ggatatatgc	960
aaggctgcaa tgggatttag aatcagctca tccttcagct ttgggggtt tacattnaa	1020
agaacaagcg ggtcatcagt caaaagagag gaagaagtgc ttacaggcaa tctccaaaca	1080

ES 2 913 063 T3

ttgaaaataa	gagtacatga	gggttacgag	gagttcacaa	tggggaa	aagagcaaca	1140
gctataactca	gaaaagcaac	caggagattt	gttcaactca	tagtgagtgg	aagggacgaa	1200
cagtcaatag	ccgaagcaat	aatcgtggcc	atggtgtttt	cacaagagga	ttgcatgata	1260
aaagcagttt	gaggtgacct	gaatttcgtt	aacaggcAA	atcagcggtt	gaaccccatt	1320
catcagcttt	taaggcattt	tcagaaagat	gcgaaggtgc	ttttcagaa	ttggggatt	1380
gaacacatcg	acagtgttat	ggaaatggtt	ggagtattac	cagatatgac	tccaaggcaca	1440
gagatgtcaa	tgagaggaat	aagagtca	aaaatggcg	tggatgaata	ctccagcaca	1500
gagagggtgg	tggtagcat	tgatcggtt	ttgagagttc	gagaccaacg	tggaatgt	1560
ttattatctc	ctgaggaggt	cagtcaaaca	caggaaacag	agagactgac	aataacttac	1620
tcatcgtaa	tgtatgtggg	gattaacgg	cctgagtcgg	ttttgtcaa	tacctatcaa	1680
tgggtcatca	gaaattggg	aactgtcaa	attcaatgg	ctcagaatcc	tgcaatgtt	1740
tacaacaaaa	tgaaatttga	accattcaa	tcttagttc	ctaaggccat	tagaggccaa	1800
tacagtggat	ttgtcagaac	tctattccaa	caaattgagag	atgtacttgg	gacatttgat	1860
accatccaga	taataaagct	tctccctttt	gcagccgctc	caccaaaagca	aagcagaatg	1920
cagttctctt	cattgactgt	aaatgtgagg	ggatcaggga	tgagaatact	tgtaaggggc	1980
aattctccctg	tattcaacta	caacaagacc	actaaaagac	taacaattct	cggaaaagat	2040
gccggcactt	taattgaaga	cccagatgaa	agcacatccg	gagtggagtc	cgctgtctt	2100
agaggatttc	tcattctagg	taaggaagac	agaagatacg	gaccagcatt	aagcatcaat	2160
gaactgagta	accttgcaaa	agggaaaag	gctaattgtgc	taattggca	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	cttaaaagt	60
ccagcacaaa	atgctataag	cacaacttcc	ccttataccg	gagaccctcc	ttacagccat	120
gggacaggaa	caggatacac	catggatact	gtcaacagga	cacatcagta	ctcagaaaag	180
gcaagatgga	caacaaacac	cgaaactgga	gcacccgcaac	tcaaccgat	tgtatggcca	240
ctgccagaag	acaatgaacc	aagtggttat	gcccaaacag	attgtgtatt	ggaagcaatg	300
gcttccttg	agaatccca	tcctggattt	tttggaaact	cgtgtattga	aacgatggag	360

ES 2 913 063 T3

gttgttcagc aaacacgagt agacaagctg acacaaggcc gacagaccta tgactggact	420
ttaaatagaa accagcctgc tgcaacagca ttggccaaca caatagaagt gttcagatca	480
aatggcctca cggccaatga gtctggaagg ctcatagact tccttaagga tptaatggag	540
tcaatgaaaa aagaagaat ggggatcaca actcatttc agagaaagag acgggtgaga	600
gacaatatga ctaagaaaat gataacacag agaacaatag gtaaaaggaa acagagattg	660
aacaaaagga gttatcta at tagagcattt accctgaaca caatgaccaa agatgctgag	720
agagggaaagc taaaacggag agcaattgca accccaggga tgcaaataag ggggtttgta	780
tactttgtt agacactggc aaggagtata tgtgagaaac ttgaacaatc agggttgcca	840
gttggaggca atgagaagaa agcaaagttg gcaaatgtt taaggaagat gatgaccaat	900
tctcaggaca ccgaacttcc ttgaccatc actggagata acaccaaatg gaacgaaaat	960
cagaatcctc ggatgtttt ggccatgatc acatatatga ccagaaatca gcccgaatgg	1020
ttcagaaatg ttcttaagtat tgctccaata atgttctcaa acaaaatggc gagactggga	1080
aaagggata tggttgagag caagagtatg aaacttagaa ctcaaatacc tgcaaaaaatg	1140
ctagcaagca ttgattt gaaatattcaat gattcaacaa gaaagaagat tgaaaaaaatc	1200
cgaccgctct taatagaggg gactgcatca ttgagccctg gaatgatgat gggcatgttc	1260
aatatgttaa gcactgttatt aggcgtctcc atcctgaatc ttggacaaaa gagatacacc	1320
aagactactt actgggtggga tggtotcata tcctctgacg attttgcctt gattgtgaat	1380
gcacccaatc atgaaggat tcaagccgga gtcgacaggt tttatcgaac ctgtaaatca	1440
catggaatca atatgagcaa gaaaaagtct tacataaaca gaacaggtac atttgaattc	1500
acaagtttt tctatcgta tgggtttgtt gccaatttca gcatggagct tcccagttt	1560
ggtgtgtctg ggagcaacga gtcagcggac atgagtattt gagttactgt catcaaaaac	1620
aatatgataa acaatgatct tggccagca acagctcaaa tggcccttca gttgttcatc	1680
aaagattaca ggtacacgta ccgatgccat agaggtgaca cacaataca aacccgaaga	1740
tcatttggaaa taaagaaaact gtgggagcaa acccggttcca aagctggact gctggctcc	1800
gacggaggcc caaatttata caacattaga aatctccaca ttccctgaagt ctgcctaaaa	1860
tggaaattga tggatgagga ttaccagggg cgtttatgca acccaactgaa cccatttgc	1920
agccataaaag aaattgaatc aatgaacaat gcagtgtatg tgccagcaca tggccagcc	1980
aaaaacatgg agtatgtgc tggcaaca acacactcct ggatccccaa aagaaatcga	2040
tccatcttga atacaagtca aagaggagta cttgaagatg aacaaatgtt ccaaagggtgc	2100
tgcaatttat ttgaaaaatt cttcccccagc agttcataca gaagaccagt cgggatatcc	2160
agtatggtg aggctatggt ttccagagcc cgaattgtatg cacggattga ttctgaatct	2220
ggaaggataa agaaagaaga gttcaactgag atcatgaaga tctgttccac cattgaagag	2280

ES 2 913 063 T3

ctcagacggc aaaaatagtg aatttagctt gtccttcatg aaaaaatgcc ttgttcctac	2340
t	2341

<210> 6
<211> 2341
5 <212> ADN
<213> Virus de la gripe
<400> 6

ES 2 913 063 T3

agcaaaagca ggcaaaccat ttgaatggat gtcaatccga ctctactgtt cctaaaggtt	60
ccagcgcaaa atgccataag caccacattc ccttatactg gggatcctcc atacagccat	120
ggaacaggaa caggg tacac catggacaca gtcaacagaa cacaccaata ttcagagaag	180
ggaaagtggc cgacaaatac agaaactggg gcaccccaac tcaacccaat tgatggacca	240
ctacctgagg ataatgagcc aagtggatat gcacaaacag actgtgtcct ggaggctatg	300
gccttccttg aagaatccc cccaggtatc tttgagaact catgccttga aacaatggaa	360
gtcggtcaac aaacaagggt ggacaaacta actcaaggc gccagactta tgattggaca	420
ttaaacagaa atcaaccagc agcaactgca ttagccaaca ccatagaagt ttttagatcg	480
aatggactaa cagcta atgaaatc atcaggagg ctaatagatt tcctcaagga tgtgatggaa	540
tcaatggata aagaggaaat ggagataaca acacacttc aaagaaaaag gagagtaaga	600
gacaacatga ccaagaaaat ggtcacacaa agaacaatag ggaagaaaaa acaaagagt	660
gataagagag gctatcta aagagcttg acattgaaca cgatgaccaa agatgcagag	720
agaggtaaat taaaaagaag ggctattgca acacccggga tgcaaattag agggttcgtg	780
tacttcgttg aaactttgc tagaagcatt tgcaaaaagc ttgaacagtc tggactcccg	840
gttggggta atgaaaagaa ggccaaactg gcaaatgtt tgagaaaaat gatgactaat	900
tcacaagaca ctgagcttc tttcacaatc actggggaca acactaagtg gaatgaaaat	960
caaaaaccctc gaatgtttt ggcgtatgatt acatatatca caaaaaatca acctgagtgg	1020
ttcagaaaca tcctgagcat cgaccaata atgttctcaa acaaaatggc aagacttagga	1080
aaaggataca tgttcgagag taagaggatg aagctccgaa cacaatacc cgccagaaatg	1140
ctagcaagca ttgacctgaa gtattcaat gaatcaacaa ggaagaaaaat tgagaaaaata	1200
aggcctcttc taatagatgg cacagcatca ttgagccctg ggatgtatgat gggcatgttc	1260
aacatgctaa gtacggttt aggagtctcg atactgaatc ttggcaaaaa gaaatacacc	1320
aagacaacat actgggtggaa tgggtccaa tcctccgacg atttgcctt catagtgaat	1380
gcaccaaatc atgaggaaat acaagcagga gtggatagat tctacaggac ctgcaagtta	1440
gtggaaatca acatgagcaa aaagaagtcc tatataaata aaacaggac atttgaatc	1500
acaagctttt tttatcgata tggattgtg gctaattttt gcatggagct tcccgatttt	1560

ggagtgtctg gaataaacga gtcagctgat atgagcattg gagtaacagt gataaagaac 1620
 aacatgataa acaatgacct tggaccagca acagcccaga tggctctcca attgttcatc 1680
 aaagactaca gatatacata taggtgccat agaggagaca cacaattca gacgagaaga 1740
 tcattcgagc taaaagaagct gtggatcaa accaatcaa gggcaggact attggtatca 1800
 gatggggac caaaacttata caatatccgg aacccatcaca tccctgaagt ctgcttaaag 1860
 tgggagctaa tggatgagaa ttatcagggaa agactttgtaa accccctgaa tcccttgta 1920
 agccataaaag aaatttagtc tgtaaacaat gctgttgta tgccagccca tggtccagcc 1980
 aaaagtatgg aatatgatgc cggtcaact acacactcct ggattccaa gaggaccgc 2040
 tctattctca acacaagcca aagggaaatt ctgaggatg aacagatgtt ccaaaagtgc 2100
 tgcaacttgt ttgagaaatt ttccctagt agttcatata ggagaccgat tggaaatttct 2160
 agcatggtgg aggccatggt gtctaggcc cggttgcgtt ccagaattga ctgcgttct 2220
 ggacggatta agaaggaaga gttcttgag atcatgaaga tctgttccac cattgaagaa 2280
 ctcagacggc aaaaataatg aattttgtt gtccttcattt aaaaaatgcc ttgtttctac 2340
 t 2341

5 <210> 7
 <211> 2341
 <212> ADN
 <213> Virus de la grippe

<400> 7

agcaaaagca ggcaaacat ttgaatggat gtcaatccga ctctactttt cctaaagggtt 60
 ccagcgcaaa atgccataag caccacattc ccctatactg gagatcctcc atacagccat 120
 ggaacagggaa caggatacac catggacaca gtcaacagaa cgccaccaata ttcagaaaaa 180
 gggaaatggaa cgacaaacac agaaactggg gcaccccaac tcaacccgtt tgatggacca 240
 ctacctgagg ataatgagcc aagtggatat gcacaaacag actgtgttct ggaggccatg 300
 gcttccttg aagaatccca cccaggatc ttgagaact catgccttga aacaatggaa 360
 gttgttcagc aaacaagggt ggataaacta actcaagggtc gccagactta tgattggaca 420
 tttaacagaa atcaaccggc agcaactgca ttggccaaaca ccatagaagt cttagatcg 480
 aatggtctaa cagctaatttga gtcagggagg ctaatagatt tcctaaagga tgtgttgaa 540
 tcaatggata aagaggaaat agagataaca acacacttcc aaagaaaaag gagagtaaga 600
 gacaacatga ccaagaaaaat ggtcacacaa agaacaatag gaaagaaaaa acaaagagt 660
 aataagagag gctatttaat aagagcactg acattgaata cgtacccaa agatgcagag 720
 agaggccaaat taaaaagaag ggctatttgc acacccggga tgcaatggag agggttcgtt 780
 tactttgttgc aaacttttagc taggaggcatt tgcaatggag tggacttccaa 840

gttggggta atgaaaagaa ggccaaattg gcaaatgtt tgagaaagat gatgactaat	900
tcacaagaca cagagcttc tttcacaatc actggggaca acactaagtg gaatgaaaat	960
caaaatcctc gaatgttcct ggcgatgatt acatatatca caaaaaatca acctgagtgg	1020
ttcagaaaca tcctgagcat cgcacccata atgttctcaa acaaaatggc aagacttagga	1080
aaagggtaca tggcgagag taaaagaatg aagctccgaa cacaaatacc agcagaaaatg	1140
ctagcaagca ttgacctgaa atatttcaat gaatcaacaa ggaagaaaat tgagaaaata	1200
aggcctttc taatagatgg cacagcatca ttgagccctg gaatgatgat gggcatgttc	1260
aacatgctaa gtacggtttt gggagtctcg atactgaatc ttggacaaaa gaaatacacc	1320
aagacaacat actggtgga tgggctccaa tcctccgacg atttgccct catagtgaat	1380
gcaccaaattc atgagggat acaagcagga gtggatagat tttacaggac ctgcaagttt	1440
gtgggaatca acatgagcaa aaagaagtcc tatataaaata agacagggac atttgaattc	1500
acaagctttt tttatcgcta tggatttgc gctaattttt gcatggagct gcccagtttt	1560
ggagtgtctg gaataaatga atcagctgat atgagcattt gagtaacagt gataaagaac	1620
aacatgataa acaatgaccc tggaccagca acagcccaga tggcccttca attgttcatc	1680
aaagactaca gatatacata tagatccat agaggagaca cacaaattca gacgagaaga	1740
tcattcgagc taaaagaagct gtgggatcaa acccaatcaa aggccaggact attagtgtca	1800
gatggaggac caaacttata caatatccgg aatcttcaca ttctgaagt ctgcttaaaa	1860
tgggagctaa tggatgagga ttatcgaaaa agactttgtt atccccctgaa tccctttgtc	1920
agccataaaag agattgagtc tgtaaacaat gctgtggtga tgccagccca tggccagcc	1980
aaaagcatgg aatatgatgc cggtcaact acacacttcc ggattcccaa gaggaaccgc	2040
tctattctca acacaagcca aagggaaatt ctggaggatg aacagatgtt ccagaagtgc	2100
tgcaacctgt tcgagaaatt ttccccagt agttcataca ggagaccggg tggatattct	2160
agcatggtgg agggcatggt gtctaggcc cgattgttgc ccagaattga ctgcgagtct	2220
ggaaggatta agaaagaaga gttctctgag atcatgaaga tctgttccac cattgaagaa	2280
ctcagacggc aaaaataatg aatttagctt gtccttcattg aaaaaatgcc ttgtttctac	2340
t	2341

<210> 8
 <211> 2233
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

<400> 8

ES 2 913 063 T3

agcgaaagca ggtactgatc caaaaatggaa gattttgtgc gacaatgctt caatccgatg	60
attgtcgagc ttgcggaaaa aacaatgaaa gagtatgggg aggacctgaa aatcgaaaca	120

ES 2 913 063 T3

aacaatgg cagcaatatg cactcacttg gaagtatgct tcatttgc agatccac
ttcatcaatg agcaaggcga gtcaataatc gtagaacttg gtgatccaaa tgcactttg
aagcacagat ttgaaataat cgagggaga gatcgaccaa tggcctggac agtagtaaac
agtatttgc acactacagg ggctgagaaa ccaaagttc taccagattt gtatgattac
aaggagaata gattcatcga aattggagta acaaggagag aagttcacat atactatctg
gaaaaggcca ataaaattaa atctgagaaa acacacatcc acatttctc gttcactggg
gaagaaatgg ccacaaaggc agactacact ctcgatgaag aaagcagggc taggatcaaa
accagactat tcaccataag acaagaaatg gccagcagag gcctctggg ttccttcgt
cagtccgaga gaggagaaga gacaattgaa gaaaggttt aatcacagg aacaatgcgc
aagcttgc accaaagtct cccgccaac ttctccagcc ttgaaaattt tagagctat
gtggatggat tcgaaccgaa cggctacatt gagggcaagc tgtctcaa atgtccaaagaa
gtaaatgcta gaattgaacc tttttgaaa acaacaccac gaccacttag acttccgaat
ggcctccct gttctcagcg gtccaaattc ctgctgatgg atgccttaaa attaagcatt
gaggacccaa gtcatgaagg agagggata ccgctatatg atgcaatcaa atgcatgaga
acattcttg gatggaagga acccaatgtt gttaaaccac acgaaaaggg aataaatcca
aattatcttc tgtcatggaa gcaagtactg gcagaactgc aggacattga gaatgaggag
aaaattccaa agactaaaaa tatgaagaaa acaagtcagc taaagtggc acttggtag
aacatggcac cagaaaaggt agactttgac gactgtaaag atgttaggtga tttgaagcaa
tatgatagtg atgaaccaga attgaggtcg ctagcaagtt ggattcagaa tgatgttaac
aaggcatgct aactgacaga ttcaagctgg atagagctcg atgagattgg agaagatgtg
gctccaaattg aacacattgc aagcatgaga aggaattatt tcacatcaga ggtgtctcac
tgcagagcca cagaatacat aatgaagggg gtgtacatca atactgcctt gcttaatgca
tcttgtcag caatggatga ttccaaatta attccatga taagcaagtg tagaactaag
gagggaaaggc gaaagaccaa cttgtatggt ttcatcataa aaggaagatc ccacttaagg
aatgacacccg acgtggtaaa ctttgtgagc atggagttt ctctcaactga cccaaagactt
gaaccacata aatggggagaa gtactgtgtt cttgagatag gagatatgct tataagaagt
gccataggcc aggttcaag gcccattgttc ttgtatgtga gaacaaatgg aacctcaaaa
attaaaatga aatggggaat ggagatgagg cgttgctcc tccagtcact tcaacaaatt
gagagtatga ttgaagctga gtcctctgtc aaagagaaaag acatgaccaa agagtttt
gagaacaaat cagaaacatg gcccatttggaa ggtccccca aaggagtggaa ggaaagttcc
atggggaaagg tctgcaggac tttagtgc aagtccgtat tcaacagctt gtatgcatt

	ccacaactag aaggatttc agctgaatca agaaaactgc ttcttatcgt tcaggcttt	2040
	agggacaacc ttgaacctgg gaccttgat ctggggggc tataatgaagc aattgaggag	2100
	tgcctgatta atgatccctg ggtttgctt aatgcttctt ggttcaactc cttccttaca	2160
	catgcattga gttagttgtg gcagtgctac tatttgctat ccataactgtc caaaaaaagta	2220
	ccttgtttct act	2233
	<210> 9	
5	<211> 2233	
	<212> ADN	
	<213> Virus de la gripe	
	<400> 9	
	agcaaaagca ggtactgatt cgaaatggaa gattttgtgc gacaatgctt caaccgatg	60
	attgtcgaac ttgcagaaaa aacaatgaaa gagttatggag aggatctgaa aattgaaaca	120
	aacaatgg cagcaatatg cacccacttg gaggtatgtt tcatgtattc agatttcat	180
	ttcatcaatg aacaaggcgaa atcaataatg gttagaacttg atgatccaaa tgcaactgtta	240
	aagcacagat tcgaaataat cgagggaga gacagaacaa tggcctggac agtagtaaac	300
	agtatctgca acactactgg agctgaaaaa ccgaagtttc taccagattt gtatgattac	360
	aaggagaaca gattcatcga aattggagtg acaagaagag aagtccacat atattacctt	420
	gaaaaggcca ctaaaattaa atctgagaac acacacattc acattttctc attcaactgg	480
	gaggaaatgg ccacaaaggc agactacact ctcgacgagg aaagcagggc taggattaaa	540
	accaggctat ttaccataag acaagaaatg gccAACAGAG gcctctgggaa ttcccttcgt	600
	cagtcggaaa gaggcgaaga aacaattgaa gaaaaatttg aaatctcagg aactatgcgt	660
	aggcttggcg accaaagtct cccaccgaac ttctcctgcc ttgagaattt taggcctat	720
	gtggatggat tcgaaccgaa cggctgcatt gaggcaagc tttctcaaattt gtccaaagaa	780
	gtaatgcca aaattgaacc tttctgaag acaacaccaa gaccaatcaa acttcctaattt	840
	ggacctcattt gttatcagcg gtccaaattc ctccgtatgg atgcttgaa attgaggatt	900
	gaagacccaa gtcacgaagg agaaggattt ccattatatg atgcgtatcaa gtgcataaaaa	960
	acatttttgc gatggaaaga accttatata tcacaaaccac acgaaaaagg aataattca	1020
	aattacctgc tgcatacgaa gcaagtattt tcagaattgc aggacattga aatgaggag	1080
	aagatccaa ggactaaaaa catgaagaaa acggatcaac taaagtggc tcttggtaaa	1140
	aacatggcac cagagaaagt agactttgac aactgcagag acataagcga ttgtcaac	1200
	tatgatagtgc acgaacctga attaagggtca ctgtcaagct ggatacagaa tgatgtcaac	1260
	aaggcctgctg agcttaactga ttcaatctgg atagagctcg atgaaattgg agaggacgtt	1320
	gccccaaattt agtacattgc aagcatgagg aggaattt tcacagcaga ggtgtcccat	1380

ES 2 913 063 T3

ttagagcca ctgagtacat aatgaagggg gtatacatta atactgcct gctcaatgca	1440
tcctgtcag caatggacga tttcaatta atccccatga taagcaagt cagaactaaa	1500
gagggaaaggc gaaaaaccaa tttatatgga ttcatcataa aggaaagatc tcatttaagg	1560
aatgacacag atgtggtaaa ctttgtgagc atgaaattt ctctcactga cccgagacta	1620
gagccacata aatgggagaa atactgtgc cttgagatag gagatatgtt actaagaagt	1680
gccataggcc aaatttcaag gcctatgttc ttgtatgtt ggacaaacgg aacatcaaag	1740
gtcaaaatga aatgggaaat ggagatgaga cggtgcctcc ttcaagtca ctccagcagatc	1800
gagagcatga ttgaagccga gtcctcgatt aaagagaaag acatgaccaa agagttttt	1860
gagaataaaat cagaagcgtg gcccattggg gagtcccca agggagtgga agaaggttcc	1920
attggaaag tctgttaggac tctattggct aagtcagtgt tcaatagcct gtatgcata	1980
ccacaattgg aaggattttc agcggagtca agaaaaactgc ttcttgggt tcaggctctt	2040
agggacaacc tcgaacctgg gaccttgat ctcggggggc tatataagc aattgaggag	2100
tgcctgatta atgatccctg ggtttgctc aatgcatactt ggtcaactc ctccctgaca	2160
catgcattaa aatagttatg gcagtgtac tattttttat ccgtactgtc caaaaaaagta	2220
ccttgtttct act	2233

5

<210> 10
 <211> 2233
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe
 <400> 10

ES 2 913 063 T3

agcaaaagca ggtactgatt cgaaatggaa gattttgtgc gacaatgctt caacccgatg	60
attgtcgaac ttgcagaaaa ggcaatgaaa gagtatggag aggatctgaa aattgaaaca	120
aacaaatttg cagcaatatg cactcacttg gaggtatgtt tcatgtattc agatttcat	180
ttcatcaatg aacaaggta atcaatagtg gttagaacttg acgatccaaa tgcactgtta	240
aagcacagat ttgaaataat agagggaga gacagaacga tggcctggac agtagtaaac	300
agtatctgca acactactgg agctgagaaa ccgaagttc tgccagattt gtatgattac	360
aaggagaaca gattcatcga aattggagta acaaggagag aagtccacat atattacctt	420
aaaaaggcca ataaaattaa atctgagaat acacacatcc acattttctc attcactggg	480
gaggaaatgg ccacaaaggc agactacact ctcgacgagg aaagcagggc taggattaag	540
accaggctat ttaccataag acaagaaatg gccAACAGAG gcctctggga ttcccttcgt	600
cagtccaaa gaggcgaaga gacaattgaa gaaaaatttg aaatctcagg aactatgcgc	660
aggcttgccg accaaagcct cccgccgaac ttctcctgcc ttgagaattt tagagcctat	720
gtagatggat tcgaaccgaa cggctgcatt gagggcaagc tttctcaaattt gtccaaagaa	780

gtgaatgcca	aaattgaacc	tttctgaag	acaacaccaa	gaccaatcaa	acttccgaat	840
ggacccctt	gttatcagcg	gtccaaattc	cttctgatgg	atgcattaaa	attaaggcatt	900
gaagacccaa	gtcatgaagg	agaaggata	ccactatatg	atgcgatcaa	gtgcataaga	960
acattcttg	gatggaaaga	accctatata	gtcaaaccac	acgaaaaggg	aataaattca	1020
aattacctgc	tgtcatggaa	gcaagtactg	gcagaattgc	aggacattga	aactgaggag	1080
aagattccaa	gaactaaaaaa	catgaagaaa	acgagtcaac	taaagtggc	tcttggtcaa	1140
aacatggcac	cagagaaagt	agactttgac	aactgcagag	acataagcga	tttgaagcaa	1200
tatgatagt	acgaacctga	attgaggtca	ctttcaagct	ggatacagaa	ttagttcaac	1260
aaggcatgcg	agctgactga	ttcaatctgg	atagagctcg	atgaaattgg	agaagacata	1320
gcccccaattg	agtacattgc	aagcatgagg	aggaattatt	tcacagcaga	ggtgtcccac	1380
tgcagagcca	ctgagtcacat	aatgaagggg	gtatacatta	atactgcctt	gctcaatgca	1440
tcctgtgcag	caatggacga	ttttcaacta	attccatga	taagcaagt	cagaacaaaa	1500
gagggaaaggc	gaaaaaccaa	tttatatgga	ttcatcataa	aaggagatc	tcacttaagg	1560
aatgacacag	atgtggtaaa	ctttgtgagc	atggagttt	ctctcactga	cccgaggctt	1620
gagccacata	aatgggagaa	atactgtgtc	cttgagatag	gagatatgtt	actaagaagt	1680
gccataggcc	aatgtcaag	gcctatgttc	ttgtatgtga	ggacaaatgg	aacatcaaag	1740
atcaaaatga	aatgggaat	ggagatgaga	cgttgcctcc	ttcagtcact	ccagcagatc	1800
gagagcatga	ttgaagccga	gtcctcggtt	aaagagaaag	acatgaccaa	agagttttt	1860
gagaataaat	cagaagcatg	gccccattggg	gagtccccc	agggagtgg	agaaggttcc	1920
attgggaaag	tttgttaggac	tttgtggct	aagtccgtgt	tcaatagcct	gtatgcacat	1980
ccacaattag	aaggattttc	agcggagtca	agaaaaactgc	tccttgggt	tcaggctctt	2040
agggacaacc	ttgaacctgg	gaccttgat	ctggggggc	tatatgaagc	aattgaggag	2100
tgcctgatta	atgatccctg	ggtttgctc	aatgcgtctt	ggttcaactc	cttcctgaaa	2160
catgcattaa	aatagttatg	gcagtgcac	tatttggat	ccatactgtc	caaaaaagta	2220
ccttgttct	act					2233

<210> 11

<211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 11

atggctctca ctgtgggtga gcaaggcga g

31

<210> 12

ES 2 913 063 T3

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

ES 2 913 063 T3

	<211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> Cebador	
10	<400> 18 tgattcgaa 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 tcaggctt	20
45	<210> 21 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Cebador	
55	<400> 21 tccagtatgg ttttgayttc cr	22
60	<210> 22 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Cebador	
	<400> 22 tggactatgt sgagcatsat	20
	<210> 23 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador	
	<400> 23 tccccaggcg tctcccatcc	20
	<210> 24	

ES 2 913 063 T3

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

5 <400> 24

```

    agcgaaagca ggucaaauau auucaaauaug gaaagaauua aagaacuaag aaaucuaauug   60
    ucgcagucuc gcacccgcga gauacucaca aaaaccacccg ugaccauau ggccauaauc   120
    aagaaguaca caucaggaag acaggagaag acugaggggg uuccuauuc ugcccggaaaga   180
    ggacaagaga uauggggccag cacuaagcau caaugaacug agcaacccuug cgaaaggaga   240
    gaaggcuau gugcuauug ggcaaggggg ugugguguug guaaugaaac ggaaacggga   300
    c cuuacugaca gccagacagc gacaaaaga auucggauugg ccaucaauua   360
    gugucgaaua guuuaaaaac gacuuguuu 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.

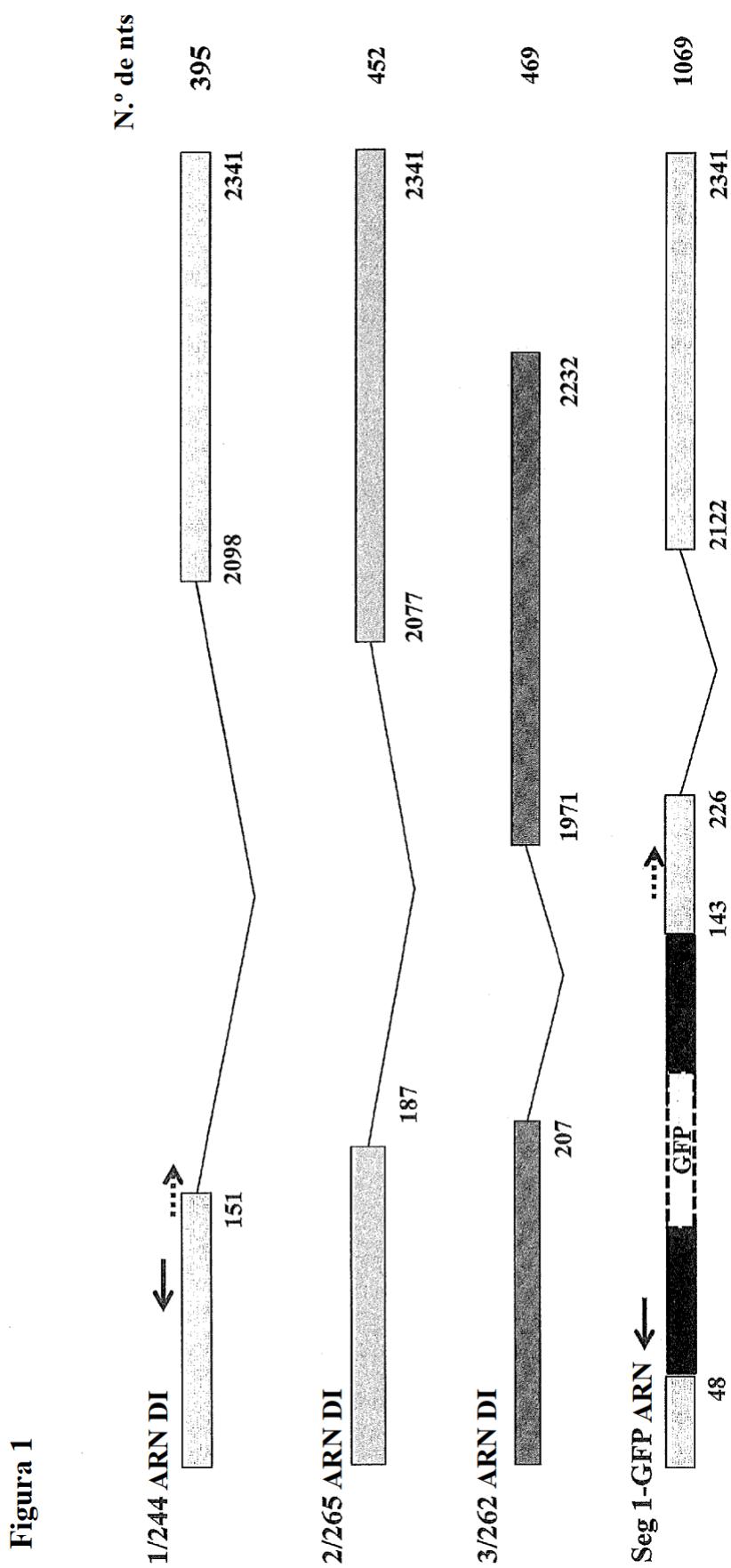


Figura 2

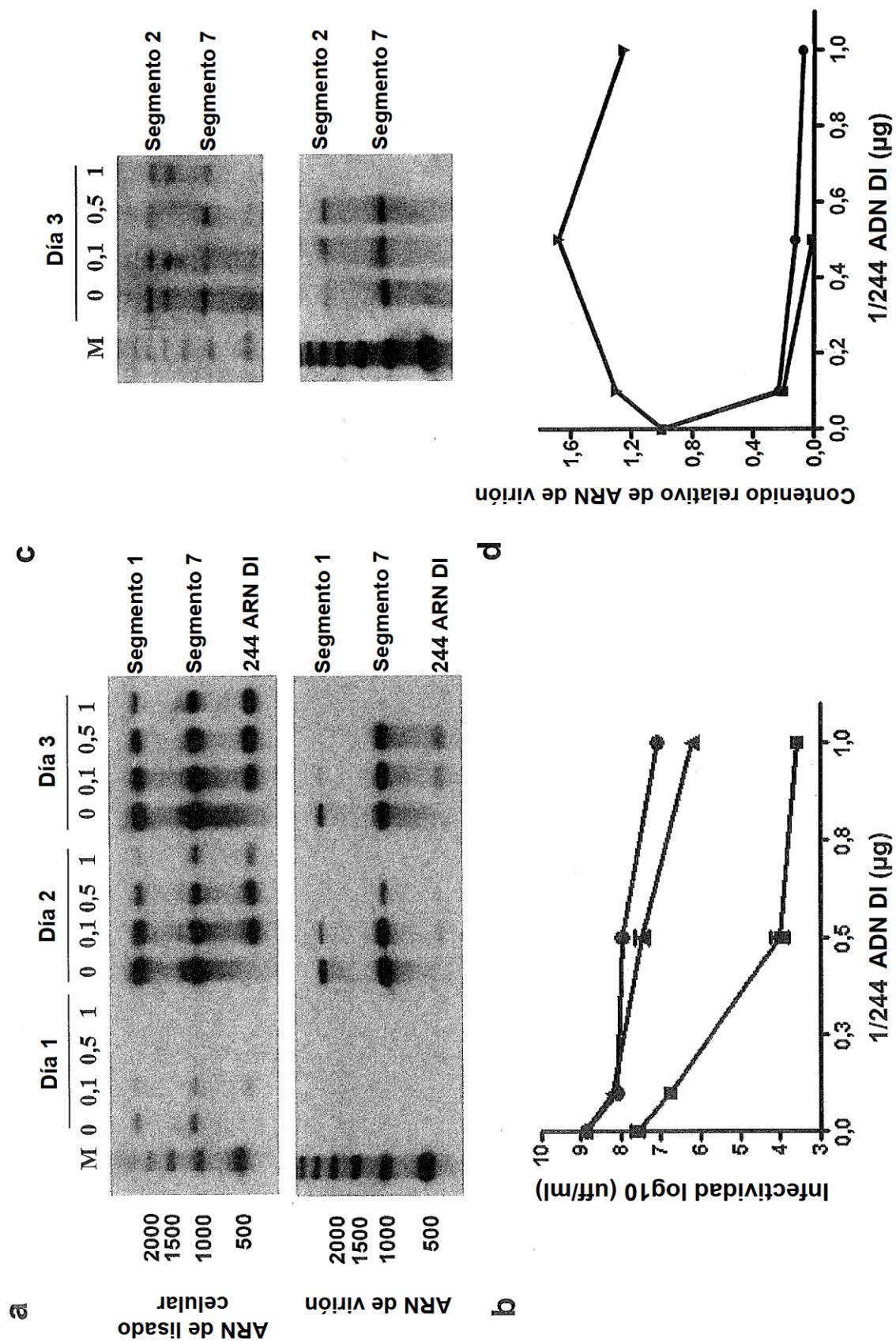


FIGURA 3a

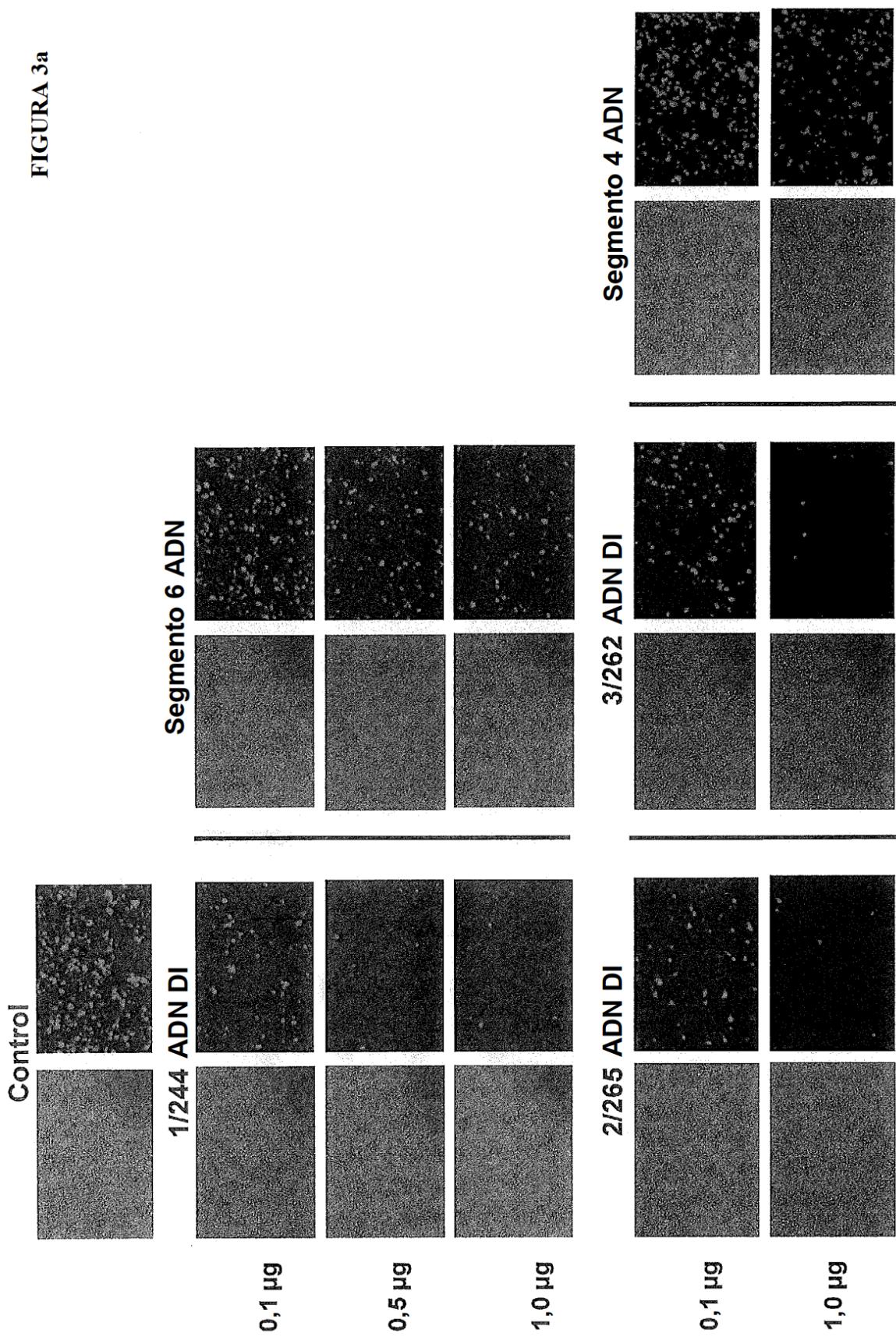


FIGURA 3b

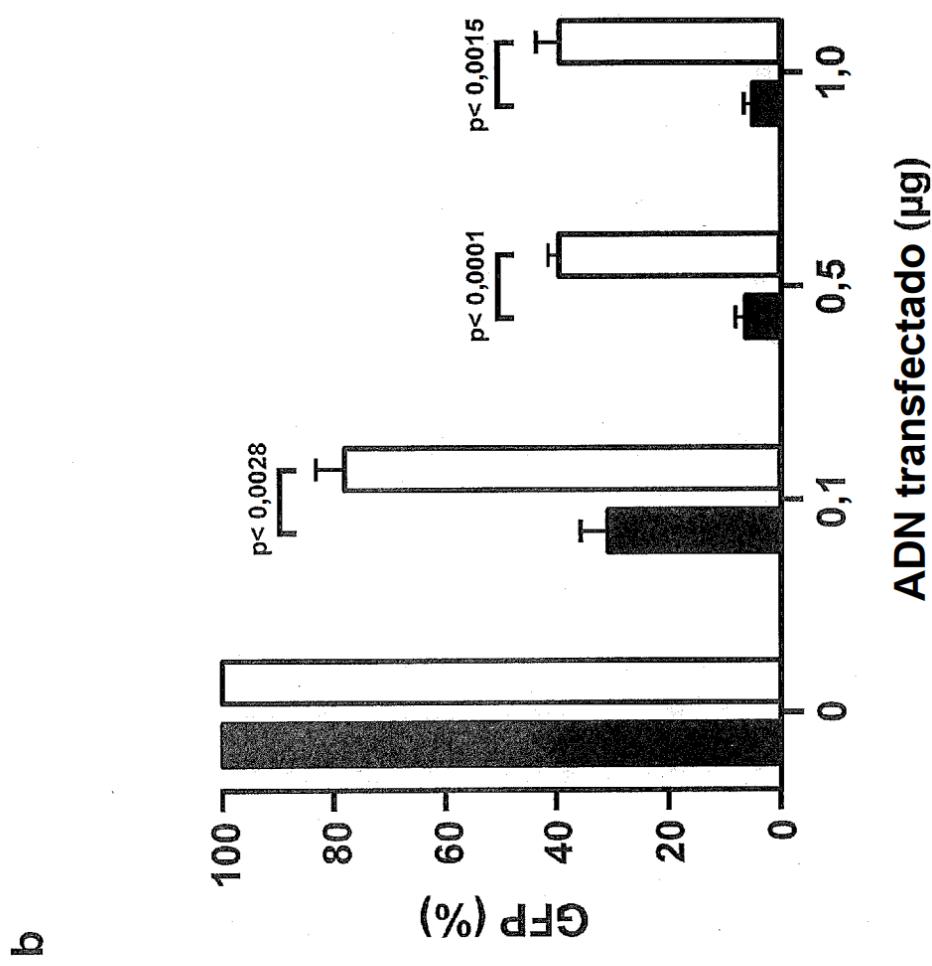


FIGURA 4

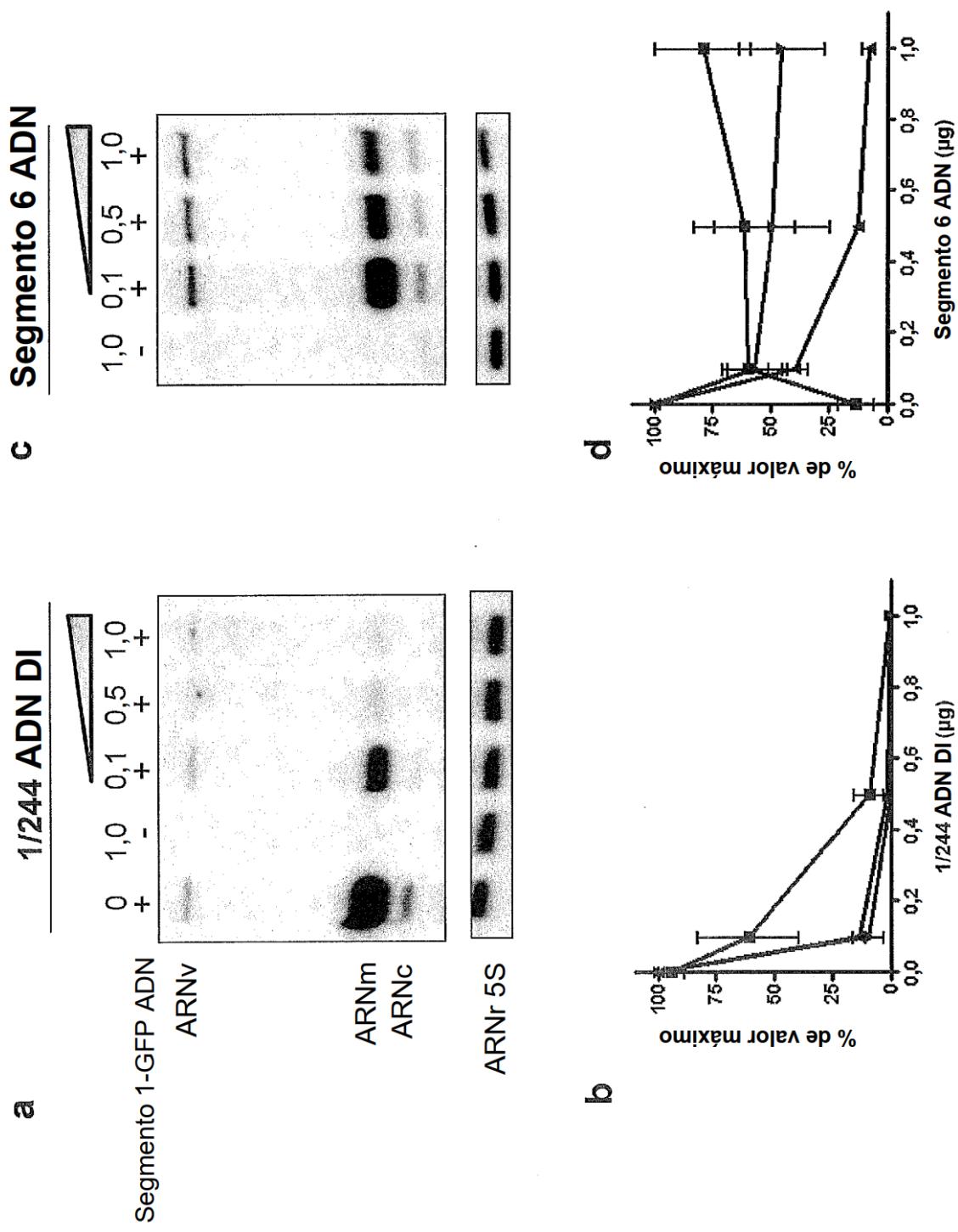


FIGURA 5

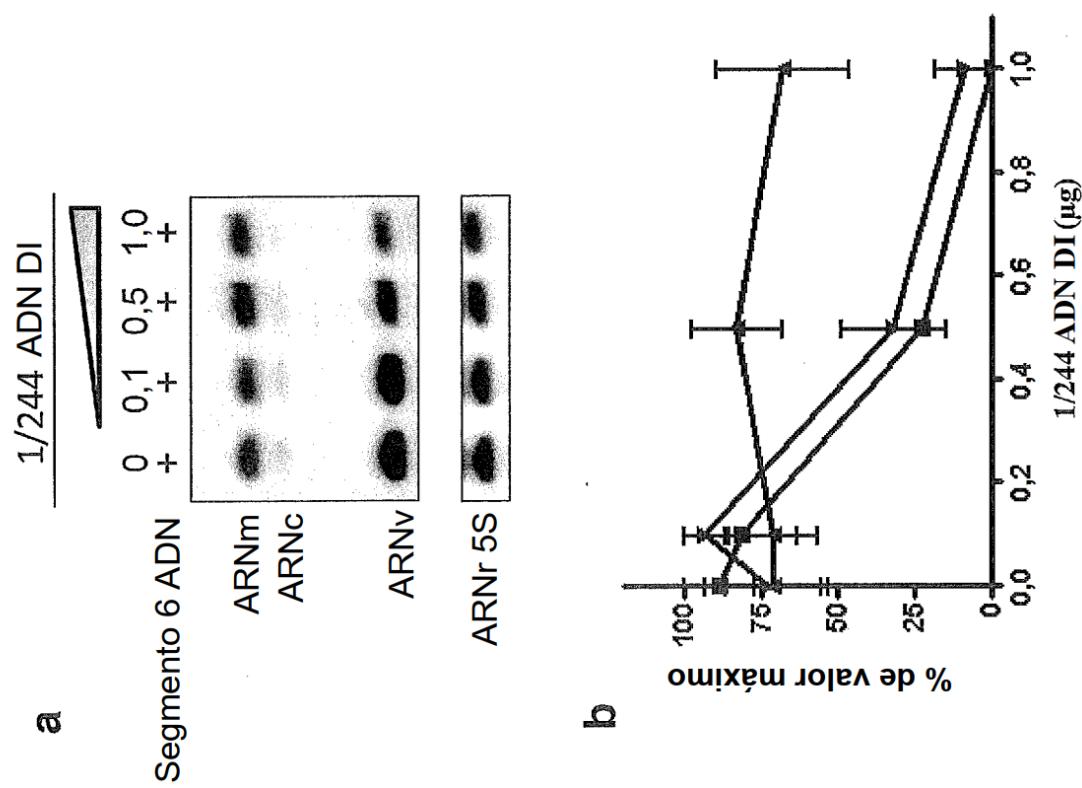


FIGURA 6

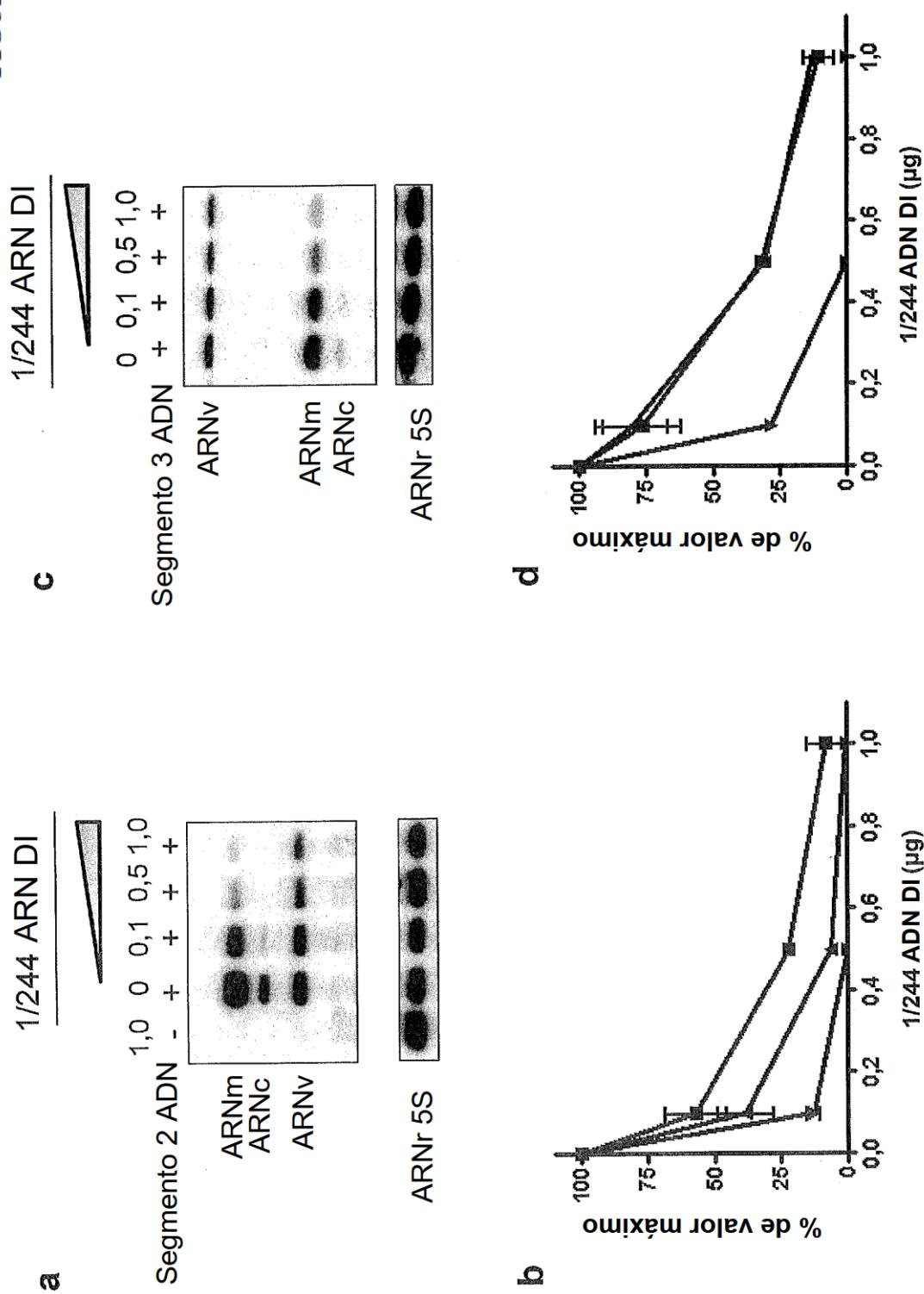


FIGURA 7

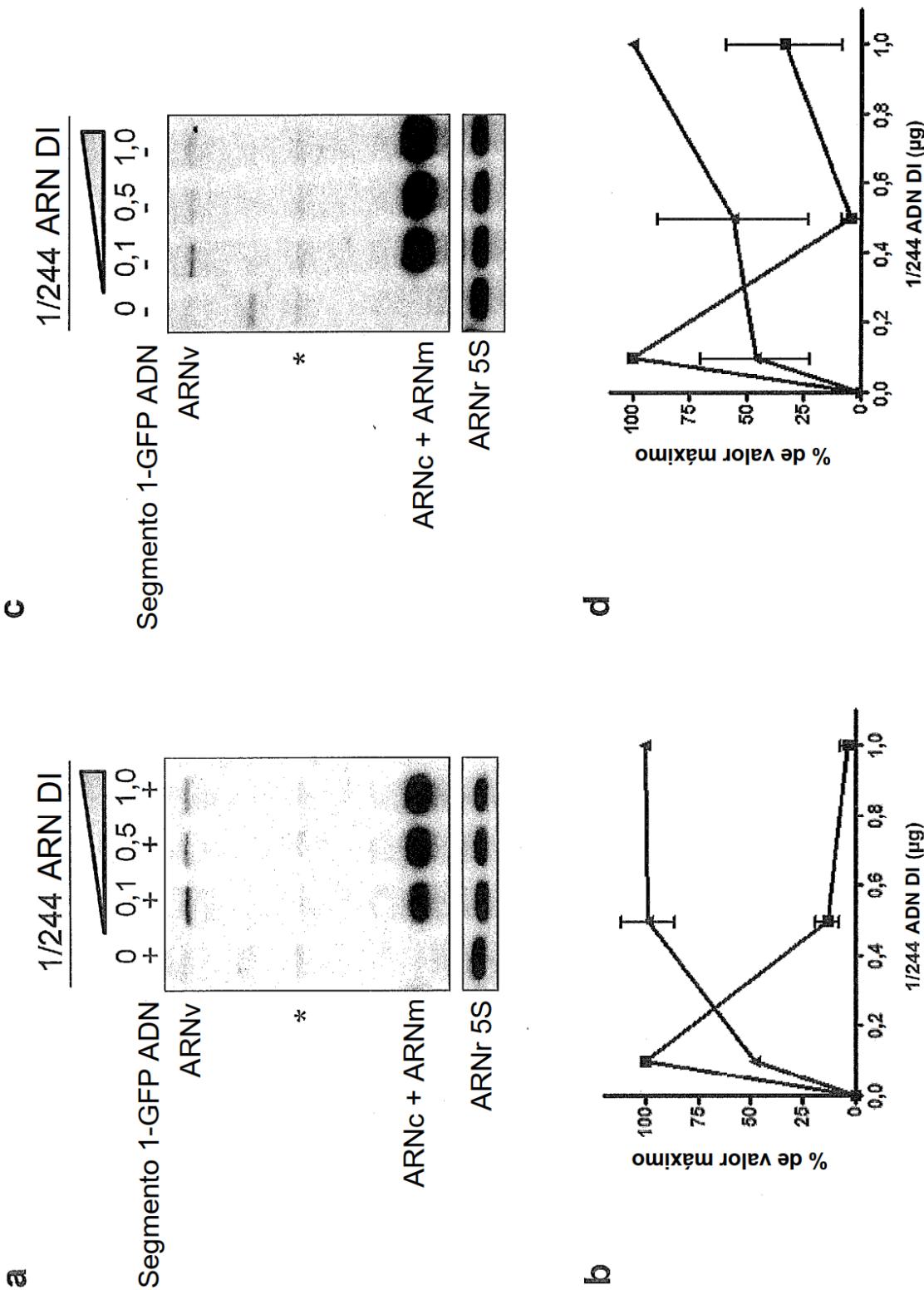


FIGURA 8

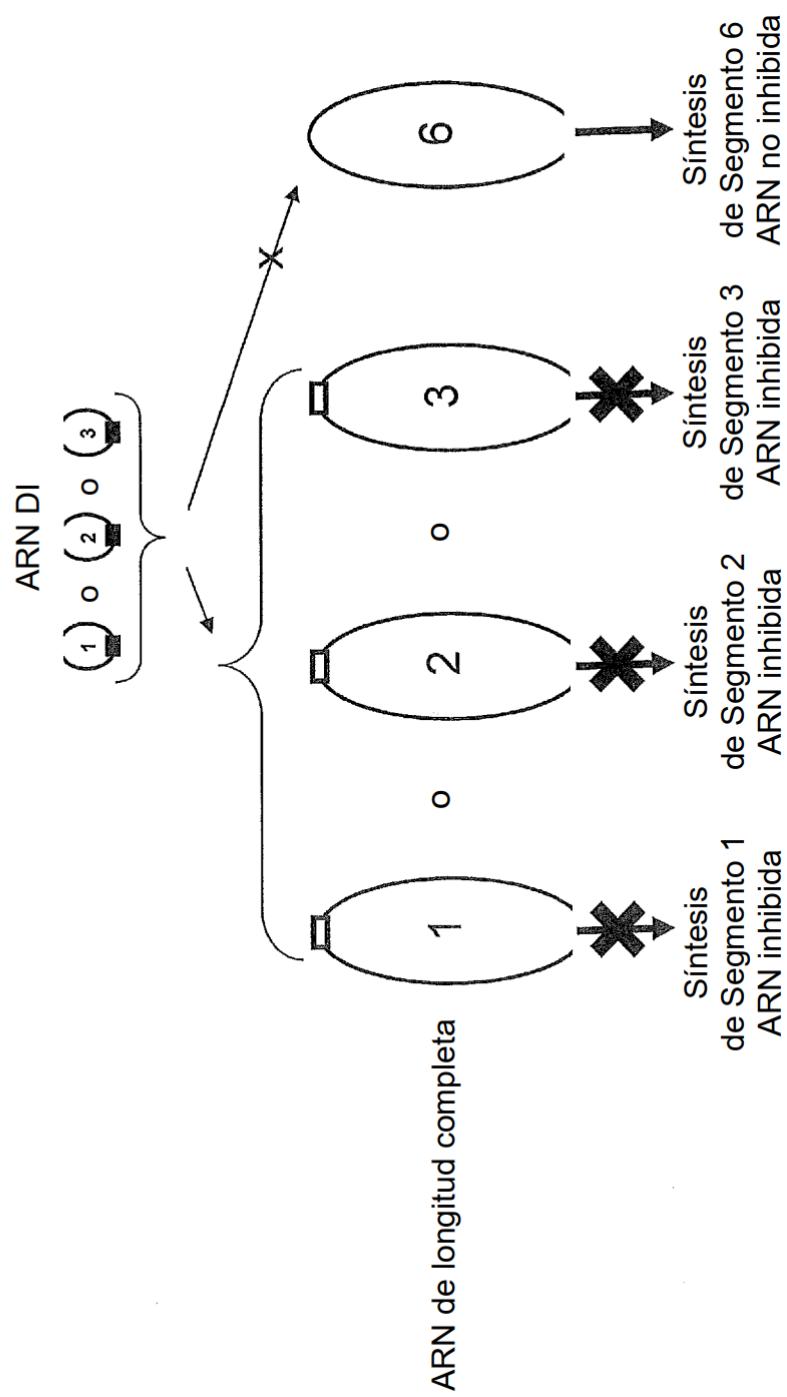


FIGURA 9

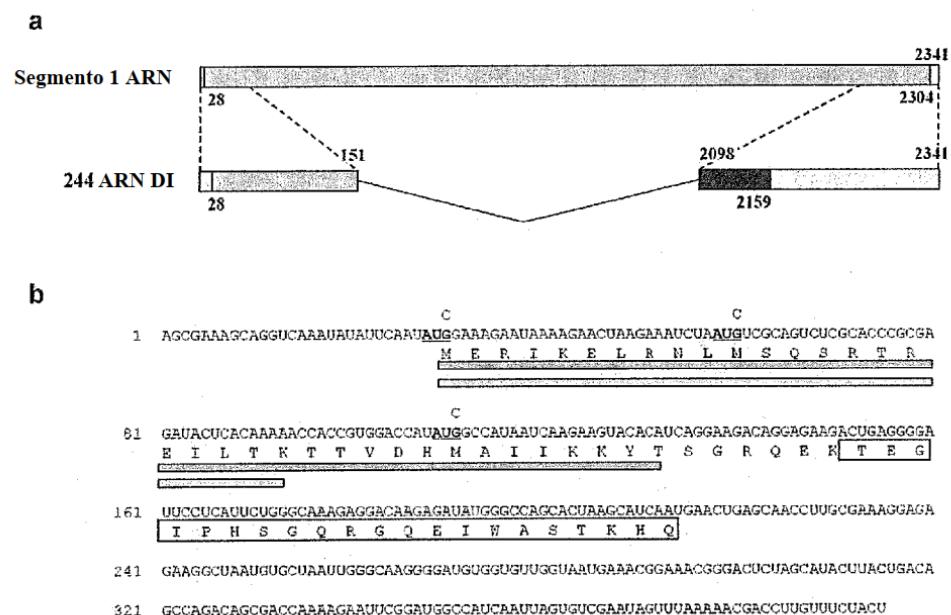


FIGURA 10

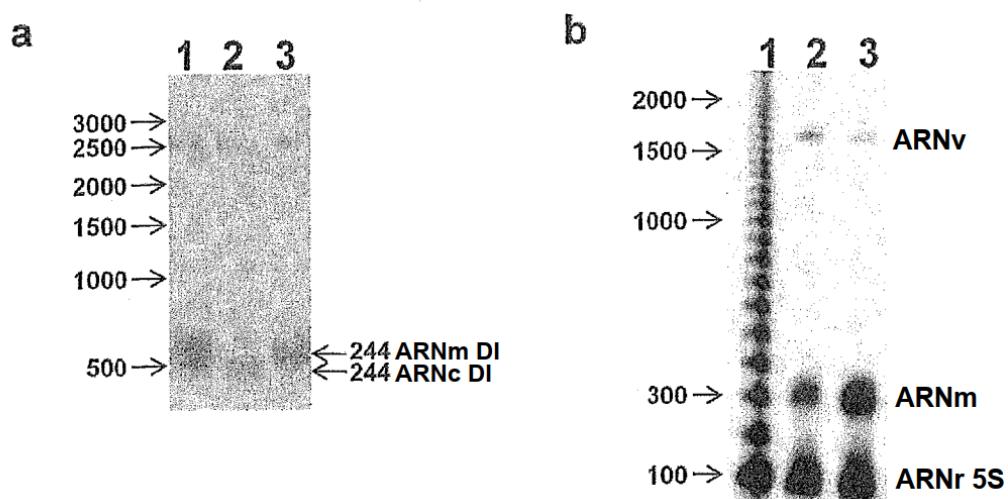
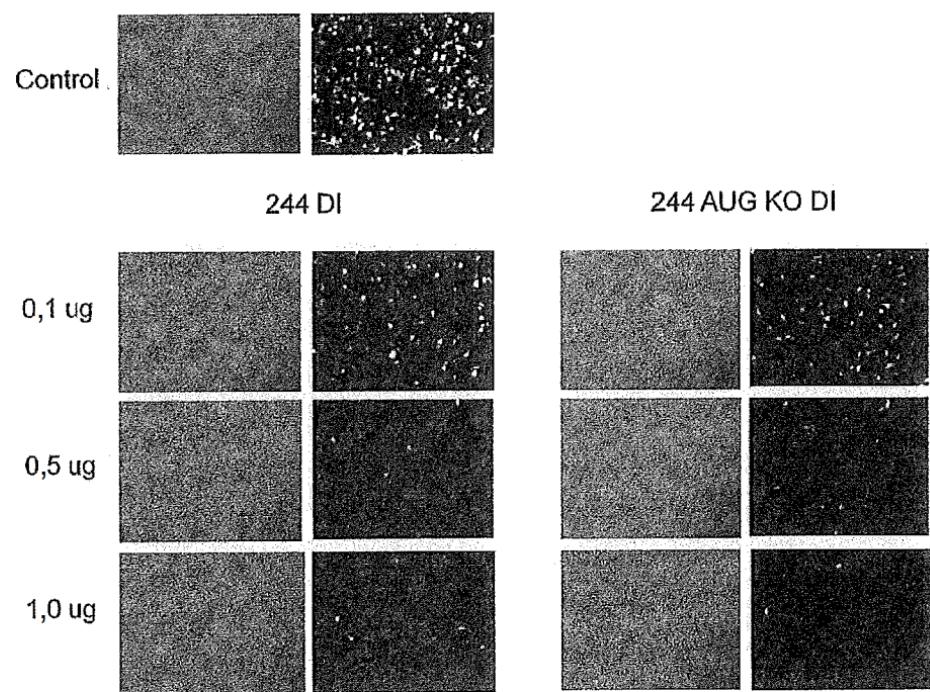


FIGURA 11

A.



B.

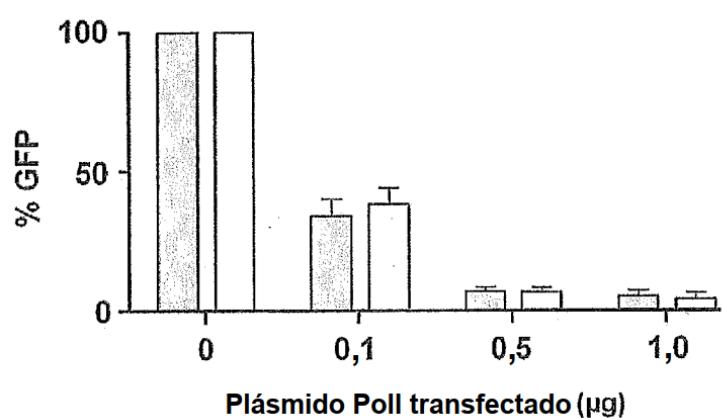


FIGURA 12