

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 811 093**

51 Int. Cl.:

C12N 15/86 (2006.01)

A61K 35/76 (2015.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.11.2015 PCT/EP2015/076458**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.05.2016 WO16075250**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2015 E 15794900 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2020 EP 3218504**

54 Título: **Arenavirus trisegmentados como vectores de vacunas**

30 Prioridad:

13.11.2014 US 201462079493 P

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

10.03.2021

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ DE GENÈVE (100.0%)
24, rue du Général-Dufour
1211 Genève 4, CH**

72 Inventor/es:

**PINSCHOWER, DANIEL DAVID;
MERKLER, DORON;
KALLERT, SANDRA MARGARETE;
KREUTZFELDT, MARIO;
DARBRE ABDELRAHMAN, STEPHANIE
GABRIELLE y
PAGE, NICOLAS JEAN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 811 093 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

Arenavirus trisegmentados como vectores de vacunas

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional de EE. UU. no. 62/079,493 presentada el 13 de noviembre, 2014.

5 **1. Introducción**

La presente solicitud se refiere a arenavirus con reordenamientos de sus marcos de lectura abiertos ("ORF") en sus genomas. En particular, en la presente memoria se describe un segmento genómico de arenavirus modificado, en donde el segmento genómico de arenavirus está preparado por ingeniería para transportar un ORF viral en una posición distinta de la posición de tipo salvaje del ORF. En la presente memoria también se describen partículas de arenavirus trisegmentadas que comprenden un segmento L y dos segmentos S o dos segmentos L y un segmento S. El arenavirus, en la presente memoria, puede ser adecuado para vacunas y/o tratamiento de enfermedades y/o para el uso en inmunoterapias.

2. Antecedentes

2.1 Investigación del virus de la coriomeningitis linfocítica y enfermedad humana

15 El virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), miembro de la familia arenaviridae, es un virus modelo de ratón prototípico en investigación sobre infecciones virales. Desde su aislamiento en la década de 1930 (Rivers y McNair Scott, 1935, *Science*, 81 (2105): 439-440), los estudios que usan este virus han descubierto muchos conceptos clave en inmunología y patogénesis viral (resumidos en Zinkemagel, 2002, *Curr Top Microbiol Immunol*, 263: 1-5; Oldstone, 2002, *Curr Top Microbiol Immunol*, 263: 83-117). El LCMV se ha utilizado ampliamente para investigar la biología molecular viral y las respuestas inmunes, particularmente en el contexto de una infección persistente. El huésped natural del LCMV son los ratones, sin embargo, varios informes revelaron que el LCMV también podría ser un patógeno humano ignorado (Barton, 1996, *Clin. Infect. Dis*, 22 (1):197; Wright *et al.*, 1997, *Pediatrics* 100 (1): E9) Además, se han encontrado muchos otros miembros de la familia arenavirus en poblaciones de roedores de todo el mundo. Además del virus Arenavirus Lassa del Viejo Mundo (LASV), que se puede encontrar en África, varios arenavirus del Nuevo Mundo como Junin (JUNV), Guanarito o Machupo prevalecen en diversas poblaciones de roedores de América del Sur (Johnson *et al.*, 1966, *Am J Trop Med Hyg*, 15 (1): 103-106; Tesh *et al.*, 1993, *Am J Trop Med Hyg* 49 (2): 227-235; Mills *et al.*, 1994, *Trop Med Hyg* 51 (5): 554-562). Tras la transmisión a los seres humanos, muchos de esos virus pueden causar fiebre hemorrágica viral asociada con alta mortalidad (Geisbert y Jahrling, 2004, *Nat Med* 10 (12 Supl): S110-121).

30 2.2 Organización genómica del virus de la coriomeningitis linfocítica

Los arenavirus son virus con cubierta. Su genoma consiste en dos segmentos de ARN monocatenario de sentido negativo (L: 7,2 kb, S: 3,4 kb). Cada segmento codifica dos genes virales en orientaciones opuestas. El segmento corto (segmento S) codifica el precursor de la glucoproteína viral (GP) (GP-C; 75 kDa) y la nucleoproteína (NP; 63 kDa) (Salvato *et al.*, 1988, *Virology* 164 (2): 517-522). El segmento largo (segmento L) expresa la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp; proteína L; aproximadamente 200 kDa) y la proteína de matriz Z (proteína Z), una proteína de dedo RING (11 kDa) (Fig. 1A) (Salvato *et al.*, 1988, *Virology* 164 (2): 517-522). El precursor de GP GP-C se escinde después de la traducción en GP-1 y GP-2, que permanecen asociados no covalentemente (Buchmeier y Oldstone 1979, *Virology* 99 (1): 111-120). Los trímeros de GP-1 y GP-2 se ensamblan como espinas en la superficie de los viriones y son esenciales para mediar la entrada en las células huésped mediante la interacción con los receptores de la superficie celular. Durante mucho tiempo se afirmó que la unión y la entrada del virus en las células huésped están mediadas por la interacción del GP de LCMV con el receptor celular α -Distroglicano como el único receptor celular para LCMV (Cao *et al.*, 1998, *Science*, 282 (5396): 2079-2081). Solo muy recientemente, se postularon tres moléculas humanas adicionales (Axl y Tyro3 de la familia TAM y el ligante de la molécula de adhesión intracelular específica de células dendríticas 3 no integrina) como receptores adicionales para LCMV y LASV, un pariente cercano de LCMV, que permite la entrada de LCMV en células independientemente de α -Distroglicano (Shimajima y Kawaoka 2012, *J Vet Med*, 74 (10): 1363-1366; Shimajima *et al.*, 2012, *J Virol* 86 (4): 2067-2078). NP se une al ARN viral, formando la nucleocápside, que sirve como molde para la proteína L viral. La nucleocápside asociada con la proteína L viral forma el llamado complejo de ribonucleoproteína, que es activo tanto en la replicación como en la transcripción y representa la unidad mínima de infectividad viral. Se ha mostrado que NP y la proteína L son los factores de transacción mínimos necesarios para la transcripción y replicación del ARN viral (Lee *et al.*, 2000, *J Virol* 74 (8): 3470-3477). Los dos genes en cada segmento están separados por una región intergénica no codificante (IGR) y flanqueados por regiones no traducidas (UTR) 5' y 3'. La IGR forma una estructura de horquilla estable y se ha mostrado que está implicada en la terminación dependiente de la estructura de la transcripción del ARNm viral (Pinschewer *et al.*, 2005, *J Virol* 79 (7): 4519-4526). Los nucleótidos terminales de la UTR muestran un alto grado de complementariedad, lo que da lugar a la formación de estructuras secundarias. Se sabe que estas estructuras de mango de sartén (*panhandle*) sirven como el promotor viral para la transcripción y la replicación, y su análisis por mutagénesis dirigida al sitio ha revelado una dependencia de la secuencia y la estructura, no tolerando cambios de secuencia ni siquiera menores (Pérez y de la Torre, 2003, *Virol* 77 (2): 1184-1194).

2.3 Sistema genético inverso

Los ARN aislados y purificados de virus de cadena negativa como LCMV no pueden servir directamente como ARNm, es decir, no se pueden traducir cuando se introducen en las células. En consecuencia, la transfección de células con ARN viral no conduce a la producción de partículas virales infecciosas. Para generar partículas virales infecciosas de virus de ARN de cadena negativa a partir de ADNc en células permisivas cultivadas, el o los segmentos de ARN viral se deben transcomplementar con los factores mínimos necesarios para la transcripción y replicación. Con la ayuda de un sistema de minigenoma que se publicó hace varios años, finalmente se pudieron analizar los elementos que actúan en cis virales y los factores que actúan en trans implicados en la transcripción, replicación y formación de partículas virales (Lee *et al.*, 2000, *J Virol* 74 (8): 3470-3477; Lee *et al.*, 2002, *J Virol* 76 (12): 6393-6397; Pérez y de la Torre 2003, *J Virol* 77 (2): 1184-1194; Pinschewer *et al.*, 2003, *J Virol* 77 (6): 3882-3887; Pinschewer *et al.*, 2005, *J Virol* 79 (7): 4519-4526.). También para otros arnavirus como LASV y el virus Tacaribe se han establecido sistemas genéticos inversos (Lopez *et al.*, 2001, *J Virol* 75 (24): 12241-12251; Hass *et al.*, 2004, *J Virol* 78 (24): 13793-13803). Dos publicaciones mostraron la recuperación de LCMV infeccioso completamente de ADNc utilizando plásmidos dirigidos por pol-I/-II o T7/pol-II, respectivamente (denominado "rescate viral") (Fitz *et al.*, 2006, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (12): 4663-4668; Sánchez y de la Torre, 2006, *Virología* 350 (2): 370-380).

2.4 LCMV recombinante que expresa genes de interés

La generación de virus de ARN de cadena negativa recombinantes que expresan genes extraños de interés se ha buscado durante mucho tiempo. Se han publicado diferentes estrategias para otros virus (García-Sastre *et al.*, 1994, *J Virol* 68 (10): 6254-6261; Percy *et al.*, 1994, *J Virol* 68 (7): 4486-4492; Flick y Hobom, 1999, *Virology* 262 (1): 93-103; Machado *et al.*, 2003, *Virology* 313 (1): 235-249). En el pasado, se ha mostrado que es posible introducir genes extraños adicionales en el genoma de partículas de LCMV bisegmentadas (Emonet *et al.*, 2009, *PNAS*, 106 (9): 3473-3478). Se insertaron dos genes extraños de interés en el genoma bisegmentado de LCMV, dando lugar a partículas de LCMV trisegmentadas (r3LCMV) con dos segmentos S y un segmento L. En el virus trisegmentado, publicado por Emonet *et al.* (2009), tanto NP como GP se mantuvieron en su respectiva posición natural en el segmento S y, por lo tanto, se expresaron bajo sus promotores naturales en la UTR flanqueante (Fig. 1B). Sin embargo, la presente solicitud revela que la partícula de LCMV trisegmentada descrita por Emonet *et al.*, ensambla partículas predominantemente bisegmentadas (es decir, el arnavirus solo empaqueta uno en lugar de dos segmentos S), lo que da lugar a un crecimiento atenuado y una fuerte presión de selección para recombinar los dos segmentos S. Como se muestra adicionalmente en la presente solicitud, dicha recombinación se encuentra de forma reproducible y da lugar a una reversión fenotípica a virus de tipo salvaje y pérdida de transgenes.

2.5 Arnavirus deficiente en la replicación

Recientemente, se ha mostrado que una partícula de arnavirus infecciosa se puede preparar por ingeniería para contener un genoma con la capacidad de amplificar y expresar su material genético en células infectadas pero incapaz de producir más progenie en células normales, no preparadas por ingeniería genética (es decir, una partícula de arnavirus infecciosa deficiente en la replicación) (Publicación Internacional No.: WO 2009/083210 A1 y Publicación Internacional No.: WO 2014/140301 A1).

3. Resumen de la invención

La presente solicitud se refiere a arnavirus con reordenamientos de sus ORF en sus genomas. En particular, la presente solicitud se refiere a un segmento genómico de arnavirus que ha sido preparado por ingeniería para portar un ORF de arnavirus en una posición distinta de la posición de tipo salvaje. La presente solicitud también proporciona una partícula de arnavirus trisegmentada que comprende un segmento L y dos segmentos S o dos segmentos L y un segmento S que no se recombinan en una partícula de arnavirus bisegmentada competente para la replicación. La presente solicitud demuestra que la partícula de arnavirus trisegmentada puede prepararse por ingeniería para mejorar la estabilidad genética y asegurar una expresión transgénica duradera.

La invención proporciona una partícula de arnavirus infecciosa trisegmentada y competente para la replicación que comprende un segmento L y dos segmentos S, en donde uno de los dos segmentos S se selecciona del grupo que consiste en:

- (i) un segmento S, en donde el ORF que codifica la NP está bajo el control de una 5' UTR de arnavirus;
- (ii) un segmento S, en donde el ORF que codifica la proteína Z está bajo el control de una 5' UTR de arnavirus;
- (iii) un segmento S, en donde el ORF que codifica la proteína L está bajo el control de una 5' UTR de arnavirus;
- (iv) un segmento S, en donde el ORF que codifica la GP está bajo el control de una 3' UTR de arnavirus;
- (v) un segmento S, en donde el ORF que codifica el L está bajo el control de una 3' UTR de arnavirus; y
- (vi) un segmento S, en donde el ORF que codifica la proteína Z está bajo el control de una 3' UTR de arnavirus, en donde la partícula de virus trisegmentada comprende dos ORF heterólogos.

La invención proporciona una partícula de arnavirus infecciosa trisegmentada y competente para la replicación que comprende dos segmentos L y un segmento S, en donde uno de los dos segmentos L se selecciona del grupo que consiste en:

- (i) un segmento L, en donde el ORF que codifica la GP está bajo el control de una 5' UTR de arnavirus;
- 5 (ii) un segmento L, en donde el ORF que codifica la NP está bajo el control de una 5' UTR de arnavirus;
- (iii) un segmento L, en donde el ORF que codifica la proteína L está bajo el control de una 5' UTR de arnavirus;
- (iv) un segmento L, en donde el ORF que codifica la GP está bajo el control de una 3' UTR de arnavirus;
- (v) un segmento L, en donde el ORF que codifica la NP está bajo el control de una 3' UTR de arnavirus; y
- (vi) un segmento L, en donde el ORF que codifica la proteína Z está bajo el control de una 3' UTR de arnavirus,
- 10 en donde la partícula de virus trisegmentada comprende dos ORF heterólogos.

Además, la invención proporciona un ADNc del genoma de la partícula de arnavirus trisegmentada de la invención. La invención también proporciona un vector de expresión de ADN que comprende el ADNc.

Además, la invención proporciona una célula huésped que comprende la partícula de arnavirus trisegmentada, el ADNc o el vector de la invención.

- 15 Además, la invención proporciona un método para generar la partícula de arnavirus trisegmentada de la invención, en donde el método comprende:

- (i) transfectar en una célula huésped uno o más ADNc de un segmento L y dos segmentos S;
- (ii) mantener la célula huésped en condiciones adecuadas para la formación de virus; y
- (iii) recoger la partícula de arnavirus.

- 20 Además, la invención proporciona un método para generar la partícula de arnavirus trisegmentada de la invención, en donde el método comprende:

- (i) transfectar en una célula huésped uno o más ADNc de los dos segmentos L y un segmento S;
- (ii) mantener la célula huésped en condiciones adecuadas para la formación de virus; y
- (iii) recoger la partícula de arnavirus.

- 25 Además, la invención proporciona una vacuna que comprende una partícula de arnavirus trisegmentada de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Finalmente, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una partícula de arnavirus trisegmentada de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 30 En ciertas realizaciones, un vector viral como se proporciona en la presente memoria es infeccioso, es decir, es capaz de entrar en o inyectar su material genético en una célula huésped. En ciertas realizaciones más específicas, un vector viral como se proporciona en la presente memoria es infeccioso, es decir, es capaz de entrar en o inyectar su material genético en una célula huésped, seguido de la amplificación y expresión de su información genética dentro de la célula huésped. En ciertos ejemplos, el vector viral es un vector viral de arnavirus infeccioso y deficiente para la replicación preparado por ingeniería para contener un genoma con la capacidad de amplificar y expresar su información genética en células infectadas pero incapaz de producir más partículas de progenie infecciosas en células normales, no preparadas por ingeniería genética. En ciertas realizaciones, el vector viral de arnavirus infeccioso es competente para la replicación y puede producir más partículas de progenie infecciosas en células normales, no preparadas por ingeniería genética. En ciertas realizaciones más específicas, dicho vector viral competente para la replicación se atenúa en relación con el virus de tipo salvaje del que se deriva el vector viral competente para la replicación.
- 35

40 3.1 Marco de lectura abierto no natural

En ciertas realizaciones, el segmento genómico se prepara por ingeniería para portar un ORF viral en una posición distinta de la posición de tipo salvaje del ORF. En algunas realizaciones, el segmento genómico de arnavirus se selecciona del grupo que consiste en:

- (i) un segmento S, en donde el ORF que codifica la NP está bajo el control de una 5' UTR de arnavirus;
- 45 (ii) un segmento S, en donde el ORF que codifica la proteína Z está bajo el control de una 5' UTR arnavirus;

- (iii) un segmento S, en donde el ORF que codifica la proteína L está bajo el control de una 5' UTR arenavirus;
- (iv) un segmento S, en donde el ORF que codifica la GP está bajo el control de una 3' UTR de arenavirus;
- (v) un segmento S, en donde el ORF que codifica la proteína L está bajo el control de una 3' UTR arenavirus;
- (vi) un segmento S, en donde el ORF que codifica la proteína Z está bajo el control de una 3' UTR arenavirus;
- 5 (vii) un segmento L, en donde el ORF que codifica la GP está bajo el control de una 5' UTR arenavirus;
- (viii) un segmento L, en donde el ORF que codifica la NP está bajo el control de una 5' UTR arenavirus;
- (ix) un segmento L, en donde el ORF que codifica la proteína L está bajo el control de una 5' UTR arenavirus;
- (x) un segmento L, en donde el ORF que codifica la GP está bajo el control de una 3' UTR arenavirus;
- (xi) un segmento L, en donde el ORF que codifica la NP está bajo el control de una 3' UTR arenavirus; y
- 10 (xii) un segmento L, en donde el ORF que codifica la proteína Z está bajo el control de una 3' UTR arenavirus.

En algunas realizaciones, la 3' UTR de arenavirus es la 3' UTR del segmento S arenavirus o el segmento L arenavirus. En ciertas realizaciones, la 5' UTR arenavirus es la 5' UTR del segmento S arenavirus o el segmento L arenavirus.

- 15 También se proporciona en la presente memoria un ADNc aislado de un segmento genómico de arenavirus proporcionado en la presente memoria. También se proporciona en la presente memoria, un vector de expresión de ADN que comprende un ADNc del segmento genómico de arenavirus.

También se proporciona en la presente memoria, una célula huésped que comprende el segmento genómico de arenavirus, un ADNc del segmento genómico de arenavirus, o el vector que comprende un ADNc del segmento genómico de arenavirus.

- 20 También se describe en la presente memoria, una partícula de arenavirus que comprende el segmento genómico de arenavirus y un segundo segmento genómico de arenavirus de modo que la partícula de arenavirus comprende un segmento S y un segmento L.

En ciertas realizaciones, la partícula de arenavirus es infecciosa y competente para la replicación. En algunas realizaciones, la partícula de arenavirus está atenuada. En otros ejemplos, la partícula de arenavirus es infecciosa pero no puede producir más progenie infecciosa en células que no se complementan.

- 25 En ciertas realizaciones, al menos uno de los cuatro ORF que codifican la proteína GP, NP, Z y proteína L se elimina o se inactiva funcionalmente.

- 30 En ciertas realizaciones, al menos uno de los cuatro ORF que codifican GP, NP, la proteína Z y la proteína L se elimina y se reemplaza con un ORF heterólogo de otro organismo que no sea un arenavirus. En otras realizaciones, solo uno de los cuatro ORF que codifican GP, NP, la proteína Z y la proteína L se elimina y se reemplaza con un ORF heterólogo de otro organismo que no sea un arenavirus. En una realización más específica, el ORF que codifica GP se elimina y se reemplaza con un ORF heterólogo de otro organismo que no sea un arenavirus. En otras realizaciones, el ORF que codifica NP se elimina y se reemplaza con un ORF heterólogo de otro organismo que no sea un arenavirus. En algunas realizaciones, el ORF que codifica la proteína Z se elimina y se reemplaza con un ORF heterólogo de otro organismo que no sea un arenavirus. En otras realizaciones, el ORF que codifica la proteína L se elimina y se reemplaza con un ORF heterólogo de otro organismo que no sea un arenavirus.

- 35 En ciertas realizaciones, el ORF heterólogo codifica una proteína informadora. En algunas realizaciones, el ORF heterólogo codifica un antígeno derivado de un organismo infeccioso, tumor o alérgeno. En otras realizaciones, el ORF heterólogo que codifica un antígeno se selecciona de antígenos de virus de inmunodeficiencia humana, antígenos de virus de hepatitis C, antígeno de superficie de hepatitis B, antígenos de virus varicela zóster, antígenos de citomegalovirus, antígenos de mycobacterium tuberculosis y antígenos asociados a tumores.

En ciertas realizaciones, el crecimiento o la infectividad de la partícula de arenavirus no se ve afectado por el ORF heterólogo de otro organismo que no sea un arenavirus.

También se proporciona en la presente memoria un método para producir el segmento genómico de arenavirus. En ciertas realizaciones, el método comprende transcribir el ADNc del segmento genómico de arenavirus.

- 45 También se proporciona en la presente memoria un método para generar la partícula de arenavirus. En ciertas realizaciones, el método para generar la partícula de arenavirus comprende:

- (i) transfectar en una célula huésped el ADNc del segmento genómico de arenavirus;
- (ii) transfectar en la célula huésped un plásmido que comprende el ADNc del segundo segmento genómico de

arenavirus;

(iii) mantener la célula huésped en condiciones adecuadas para la formación de virus; y

(iv) recoger la partícula de arenavirus.

En ciertas realizaciones, la transcripción del segmento L y el segmento S se realiza usando un promotor bidireccional.

5 En ciertas realizaciones, el método comprende además transfectar en una célula huésped uno o más ácidos nucleicos que codifican una polimerasa de arenavirus. En realizaciones aún más específicas, la polimerasa es la proteína L. En otras realizaciones, el método comprende además transfectar en la célula huésped uno o más ácidos nucleicos que codifican la NP.

10 En ciertas realizaciones, la transcripción del segmento L y el segmento S están cada uno bajo el control de un promotor seleccionado del grupo que consiste en:

(i) un promotor de ARN polimerasa I;

(ii) un promotor de ARN polimerasa II; y

(iii) un promotor T7.

15 En otro ejemplo, en la presente memoria se proporciona una vacuna que comprende una partícula de arenavirus, en donde al menos uno de los cuatro ORF que codifican GP, NP, la proteína Z y la proteína L se elimina o se inactiva funcionalmente; o en donde al menos un ORF que codifica GP, NP, la proteína Z y la proteína L se elimina y se reemplaza con un ORF heterólogo de otro organismo que no sea un arenavirus; o en donde solo uno de los cuatro ORF que codifican GP, NP, la proteína Z y la proteína L se elimina y se reemplaza con un ORF heterólogo de otro organismo que no sea un arenavirus. En realizaciones más específicas, la vacuna comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 En otro ejemplo, en la presente memoria se proporciona una composición farmacéutica que comprende una partícula de arenavirus, en la que al menos uno de los cuatro ORF que codifican GP, NP, la proteína Z y la proteína L se elimina o se inactiva funcionalmente; o en donde al menos un ORF que codifica GP, NP, la proteína Z y la proteína L se elimina y reemplaza con un ORF heterólogo de otro organismo que no sea un arenavirus; o en donde solo uno de los cuatro ORF que codifican GP, NP, la proteína Z y la proteína L se elimina y se reemplaza con un ORF heterólogo de otro organismo que no sea un arenavirus. En realizaciones más específicas, el vehículo farmacéuticamente aceptable comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 En ciertas realizaciones, el segmento genómico de arenavirus o la partícula de arenavirus se deriva de LCMV. En algunas realizaciones, el segmento genómico de arenavirus o la partícula de arenavirus se deriva de la cepa LCMV MP, la cepa Armstrong o la cepa Armstrong Clon 13. En otras realizaciones, el segmento genómico de arenavirus o la partícula de arenavirus se deriva de la vacuna del virus Junin Candid # 1, o la cepa de la vacuna del virus Junin XJ Clon 3.

3.2 Arenavirus trisegmentado

35 En un aspecto, en la presente memoria se proporciona una partícula de arenavirus trisegmentada que comprende un segmento L y dos segmentos S. En algunas realizaciones, la propagación de la partícula de arenavirus trisegmentada no da lugar a una partícula viral bisegmentada competente para la replicación después de 70 días de infección persistente en ratones que carecen de receptor de interferón tipo I, receptor de interferón tipo II y gen activador de recombinación 1 (RAG1), y que han sido infectados con 10^4 UFP de la partícula de arenavirus trisegmentada. En ciertas realizaciones, la recombinación entre segmentos de los dos segmentos S, que une dos ORF de arenavirus en solo uno en lugar de dos segmentos separados, anula la actividad del promotor viral.

40 En otro aspecto, en la presente memoria se proporciona una partícula de arenavirus trisegmentada que comprende dos segmentos L y un segmento S. En ciertas realizaciones, la propagación de la partícula de arenavirus trisegmentada no da lugar a una partícula viral bisegmentada competente para la replicación después de 70 días de infección persistente en ratones que carecen de receptor de interferón tipo I, receptor de interferón tipo II y gen activador de recombinación 1 (RAG1), y que han sido infectados con 10^4 UFP de la partícula de arenavirus trisegmentada. En ciertas realizaciones, la recombinación entre segmentos de los dos segmentos L, que une dos ORF de arenavirus en solo uno en lugar de dos segmentos separados, suprime la actividad del promotor viral.

En ciertas realizaciones, uno de los dos segmentos S se selecciona del grupo que consiste en:

(i) un segmento S, en donde el ORF que codifica la NP está bajo el control de una 5' UTR de arenavirus

50 (ii) un segmento S, en donde el ORF que codifica la proteína Z está bajo el control de una 5' UTR de arenavirus;

(iii) un segmento S, en donde el ORF que codifica la proteína L está bajo el control de una 5' UTR de arenavirus;

- (iv) un segmento S, en donde el ORF que codifica la GP está bajo el control de una 3' UTR de arnavirus;
- (v) un segmento S, en donde el ORF que codifica la proteína L está bajo el control de una 3' UTR de arnavirus; y
- (vi) un segmento S, en donde el ORF que codifica la proteína Z está bajo el control de una 3' UTR de arnavirus.

En ciertas realizaciones, uno de los dos segmentos L se selecciona del grupo que consiste en:

- 5 (i) un segmento L, en donde el ORF que codifica la GP está bajo el control de una 5' UTR de arnavirus;
- (ii) un segmento L, en donde el ORF que codifica la NP está bajo el control de una 5' UTR de arnavirus;
- (iii) un segmento L, en donde el ORF que codifica la proteína L está bajo el control de una 5' UTR de arnavirus;
- (iv) un segmento L, en donde el ORF que codifica la GP está bajo el control de una 3' UTR de arnavirus;
- (v) un segmento L, en donde el ORF que codifica la NP está bajo el control de una 3' UTR de arnavirus; y
- 10 (vi) un segmento L, en donde el ORF que codifica la proteína Z está bajo el control de una 3' UTR de arnavirus.

En ciertas realizaciones, la partícula 3' UTR de arnavirus trisegmentada es la 3' UTR del segmento S de arnavirus o el segmento L de arnavirus. En otras realizaciones, la partícula 5' UTR de arnavirus trisegmentada es la 5' UTR del segmento S de arnavirus o el segmento L de arnavirus.

- 15 En ciertas realizaciones, los dos segmentos S comprenden uno o dos ORF heterólogos de un organismo distinto de un arnavirus.

En ciertas realizaciones, los dos segmentos L comprenden uno o dos ORF heterólogos de un organismo distinto de un arnavirus.

- 20 En ciertas realizaciones, el ORF heterólogo codifica un antígeno derivado de un organismo infeccioso, tumor o alergeno. En otras realizaciones, el ORF heterólogo que codifica un antígeno se selecciona de antígenos de virus de inmunodeficiencia humana, antígenos de virus de hepatitis C, antígeno de superficie de hepatitis B, antígenos de virus varicela zóster, antígenos de citomegalovirus, antígenos de mycobacterium tuberculosis y antígenos asociados a tumores.

En ciertas realizaciones, al menos un ORF heterólogo codifica una proteína fluorescente. En otras realizaciones, la proteína fluorescente es una proteína fluorescente verde (GFP) o proteína fluorescente roja (RFP).

- 25 En ciertas realizaciones, la partícula de arnavirus trisegmentada comprende los cuatro ORF de arnavirus. En algunas realizaciones, la partícula de arnavirus trisegmentada es infecciosa y competente para la replicación.

En ciertos ejemplos, la partícula de arnavirus trisegmentada carece de uno o más de los cuatro ORF de arnavirus. En otros ejemplos, la partícula de arnavirus trisegmentada es infecciosa pero no puede producir más progenie infecciosa en células que no se complementan.

- 30 En ciertos ejemplos, la partícula de arnavirus trisegmentada carece de uno de los cuatro ORF de arnavirus, en donde la partícula de arnavirus trisegmentada es infecciosa pero no puede producir más progenie infecciosa en células que no se complementan.

En algunos ejemplos, la partícula de arnavirus trisegmentada carece del ORF de GP.

- 35 En otro aspecto, en la presente memoria se proporciona una partícula de arnavirus trisegmentada que comprende un segmento L y dos segmentos S. En ciertas realizaciones, un primer segmento S está preparado por ingeniería para portar un ORF que codifica GP en una posición bajo el control de una 3' UTR de arnavirus y un ORF que codifica un primer gen de interés en una posición bajo el control de una 5' UTR de arnavirus. En algunas realizaciones, un segundo segmento S está preparado por ingeniería para portar un ORF que codifica la NP en una posición bajo el control de una 3' UTR de arnavirus y un ORF que codifica un segundo gen de interés en una posición bajo el control de una 5' UTR de arnavirus.
- 40

En otro aspecto más, en la presente memoria se proporciona una partícula de arnavirus trisegmentada que comprende un segmento L y dos segmentos S. En ciertas realizaciones, un primer segmento S está preparado por ingeniería para portar un ORF que codifica GP en una posición bajo el control de una 5' UTR de arnavirus y un ORF que codifica un primer gen de interés en una posición bajo el control de una 3' UTR de arnavirus. En algunas realizaciones, un segundo segmento S está preparado por ingeniería para portar un ORF que codifica NP en una posición bajo el control de una 5' UTR de arnavirus y un ORF que codifica un segundo gen de interés en una posición bajo el control de una 3' UTR de arnavirus.

- 45

En ciertas realizaciones, el gen de interés codifica un antígeno derivado de un organismo infeccioso, tumor o alergeno. En otras realizaciones, el gen de interés codifica un antígeno seleccionado de antígenos de virus de inmunodeficiencia

humana, antígenos de virus de hepatitis C, antígeno de superficie de hepatitis B, antígenos de virus varicela zóster, antígenos de citomegalovirus, antígenos de mycobacterium tuberculosis y antígenos asociados a tumores. En otra realización más, al menos un gen de interés codifica una proteína fluorescente. En una realización específica, la proteína fluorescente es GFP o RFP.

5 También se proporciona en la presente memoria un ADNc aislado del genoma de la partícula de arnavirus trisegmentada. También se proporciona en la presente memoria, un vector de expresión de ADN que comprende un ADNc del genoma de la partícula de arnavirus trisegmentada. También se proporciona en la presente memoria uno o más vectores de expresión de ADN que comprenden individualmente o en su totalidad el ADNc del arnavirus trisegmentado.

10 También se proporciona en la presente memoria, una célula huésped que comprende la partícula de arnavirus trisegmentada, el ADNc del genoma de la partícula de arnavirus trisegmentada, o el vector que comprende el ADNc del genoma de la partícula de arnavirus trisegmentada.

En ciertas realizaciones, la partícula de arnavirus trisegmentada se atenúa.

15 También se proporciona en la presente memoria un método para generar la partícula de arnavirus trisegmentada. En ciertas realizaciones, el método para generar la partícula de arnavirus comprende:

- (i) transfectar en una célula huésped uno o más ADNc de un segmento L y dos segmentos S;
- (ii) mantener la célula huésped en condiciones adecuadas para la formación de virus; y
- (iii) recoger la partícula de arnavirus.

20 También se proporciona en la presente memoria un método para generar la partícula de arnavirus trisegmentada. En ciertas realizaciones, el método para generar la partícula de arnavirus trisegmentada comprende:

- (i) transfectar en una célula huésped uno o más ADNc de dos segmentos L y un segmento S;
- (ii) mantener la célula huésped en condiciones adecuadas para la formación de virus; y
- (iii) recoger la partícula de arnavirus.

25 En ciertas realizaciones, la transcripción de un segmento L y dos segmentos S se realiza usando un promotor bidireccional. En algunas realizaciones, la transcripción de los dos segmentos L y un segmento S se realiza usando un promotor bidireccional.

30 En ciertas realizaciones, el método comprende además transfectar en una célula huésped uno o más ácidos nucleicos que codifican una polimerasa de arnavirus. En realizaciones aún más específicas, la polimerasa es la proteína L. En otras realizaciones, el método comprende además transfectar en la célula huésped uno o más ácidos nucleicos que codifican la proteína NP.

En ciertas realizaciones, la transcripción de un segmento L y dos segmentos S están cada uno bajo el control de un promotor seleccionado del grupo que consiste en:

- (i) un promotor de ARN polimerasa I;
- (ii) un promotor de ARN polimerasa II; y
- 35 (iii) un promotor T7.

En ciertas realizaciones, la transcripción de los dos segmentos L y un segmento S están cada uno bajo el control de un promotor seleccionado del grupo que consiste en:

- (i) un promotor de ARN polimerasa I;
- (ii) un promotor de ARN polimerasa II; y
- 40 (iii) un promotor T7.

En ciertas realizaciones, la partícula de arnavirus trisegmentada tiene el mismo tropismo que la partícula de arnavirus bisegmentada. En otros ejemplos, la partícula de arnavirus trisegmentada es deficiente para la replicación.

En otra realización, en la presente memoria se proporciona una vacuna que comprende una partícula de arnavirus trisegmentada y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 En otra realización, en la presente memoria se proporciona una composición farmacéutica que comprende una partícula de arnavirus trisegmentada y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En ciertas realizaciones, la partícula de arnavirus trisegmentada se deriva de LCMV. En algunas realizaciones, la partícula de arnavirus trisegmentada se deriva de la cepa MP de LCMV, la cepa Armstrong o la cepa Armstrong Clon 13. En otras realizaciones, la partícula de arnavirus trisegmentada se deriva de la vacuna de virus Junin Candid #1, o la vacuna de virus Junin cepa XJ Clon 3.

5 3.3 Convenciones y abreviaturas

Abreviatura	Convención
APC	Célula presentadora de antígeno
art	Artificial
CAT	Cloranfenicol acetiltransferasa
CMI	inmunidad mediada por células
CD8	Agrupación de diferenciación 8
CD4	Agrupación de diferenciación 4
GFP	Proteína verde fluorescente
GP	Glicoproteína
IGR	Región intergénica
JUNV	Virus Junin
LCMV	Virus de la coriomeningitis linfocítica
Proteína L	ARN polimerasa dependiente de ARN
Segmento L	Segmento largo
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
Proteína Z	Proteína de matriz Z
nat	Natural
NP	Nucleoproteína
ORF	Marco de lectura abierto
RFP	Proteína fluorescente roja
r2JUNV	JUNV bisegmentado recombinante
r3JUNV	JUNV trisegmentado recombinante
r2LCMV	LCMV bisegmentado recombinante
r3LCMV	LCMV trisegmentado recombinante
Segmento S	Segmento corto

Abreviatura	Convención
UTR	Región no traducida
VSV	Virus de estomatitis vesicular

4. Breve descripción de las figuras

Figura 1: Los virus trisegmentados recombinantes muestran un crecimiento alterado en comparación con el LCMV de tipo salvaje independientemente de la posición del ORF de GP en el genoma. (A-C) Representación esquemática de la organización genómica de LCMV bisegmentados y trisegmentados. El genoma bisegmentado del LCMV de tipo salvaje consiste en un segmento S que codifica GP y NP y un segmento L que codifica la proteína Z y la proteína L (A). Ambos segmentos están flanqueados por las respectivas UTR en 5' y 3'. El genoma de los LCMV trisegmentados recombinantes (r3LCMV) consiste en un segmento L y dos segmentos S con una posición donde insertar un gen de interés (aquí GFP) en cada uno de los segmentos S. (B) r3LCMV-GFP^{natural} (nat) tiene todos los genes virales en su posición natural, mientras que el ORF de GP en r3LCMV-GFP^{artificial} (art) se yuxtapone artificialmente y se expresa bajo el control de la 3' UTR (C). (D) Cinética de crecimiento de los virus indicados en células BHK-21, infectadas a una multiplicidad de infección (moi) de 0,01 (LCMV de tipo salvaje: triángulos grises; r3LCMV-GFP^{nat}: círculos negros; r3LCMV-GF^{art}: cuadrados blancos). El sobrenadante se tomó en los puntos de tiempo indicados después de la infección y las titulaciones virales se determinaron mediante un ensayo de formación de foco. Los símbolos y las barras representan la media \pm SEM de tres réplicas por grupo. Las barras de error están ocultas en el tamaño del símbolo.

Figura 2: Las preparaciones de virus trisegmentados contienen una mayoría de partículas bisegmentadas deficientes para la replicación (r2LCMV). (A) r2LCMV (barras blancas), r3LCMV-GFP/RFP^{art} (barras negras, GFP-GP, RFP-NP) y r3LCMV-GFP/RFP^{nat} (barras grises, GP-GFP, RFP-NP) se crecieron en células BHK-21 de tipo salvaje y se determinó la infectividad del sobrenadante en células BHK-21 no complementarias de tipo salvaje (BHK21), células BHK-21 que expresan GP (BHK-GP) o que expresan NP (BHK-NP). Las titulaciones en las células BHK-21 y BHK-GP se determinaron mediante tinción de focos virales positivos para NP. Las titulaciones en células BHK-21 que complementan NP se determinaron contando focos positivos para GP. Las titulaciones se normalizaron respecto a la titulación promedio obtenida cuando se evaluaron en células BHK-21, y por lo tanto se expresan como un múltiplo de las mismas. Las barras representan la media \pm SEM de seis réplicas por grupo. ns.: no estadísticamente significativo ($p \geq 0,05$); **: $p < 0,01$ por ANOVA de 1 vía seguido por la prueba posterior de Dunnett usando r2LCMV como referencia. (B) r2LCMV (gráfico izquierdo) o r3LCMV-GFP/RFP^{art} (gráfico medio y derecho) se crecieron en células BHK-21 de tipo salvaje (BHK21; gráfico izquierdo y medio) o células BHK-21 que expresan NP (BHK-NP, gráfico derecho) y se evaluó la fluorescencia 12 horas después de la infección por citometría de flujo. Las células infectadas con r2LCMV se usaron como control de activación. Se muestra un gráfico representativo por condición. (C) Cuantificación de células GFP+, RFP+ o positivas dobles GFP+ RFP+ 12 horas después de la infección con r3LCMV-GFP/RFP^{art} en células BHK-21 o BHK-NP. Las barras representan la media \pm SEM de tres réplicas por grupo. ns.: no estadísticamente significativo ($p \geq 0,05$); ***: $p < 0,001$ por ensayo de la t de student de dos colas no emparejado.

Figura 3: Diseño y cinética de crecimiento de virus trisegmentados recombinantes que portan un ORF de GP parcialmente optimizado por codones o una etiqueta genética en la IGR del segmento S. (A) Esquema del segmento S preparado por ingeniería genética en donde los 255 pares de bases C-terminales de GP están optimizados por codones y NP se reemplaza por GFP (ORF de GP denominado "WE/WET"). Se realizó la cinética de crecimiento del r3LCMV-WEWET/GFP^{nat} trisegmentado que consiste en dos segmentos S y uno L como se detalla en la Fig. 1B, con modificación del segmento S que contiene GP como se muestra en (A) en células BHK-21. El sobrenadante se tomó en los puntos de tiempo indicados después de la infección a moi = 0,01 y las titulaciones virales se determinaron por ensayo de formación de foco (B). Los símbolos y las barras representan la media \pm SEM de tres réplicas por grupo. Las barras de error están ocultas en el tamaño del símbolo. (C) Esquema del segmento S que codifica NP en donde se ha eliminado un par de bases de la IGR para "etiquetar" genéticamente este elemento de ARN no codificante. El residuo G eliminado (indicado por una flecha) se encuentra fuera de la estructura crítica de bucle-tallo de la IGR. Se realizó cinética de crecimiento comparativa de virus trisegmentados con o sin etiqueta genética en la IGR del segmento S que codifica NP (r3LCMV-GFP^{nat}: círculos negros; r3LCMV-GFP^{nat} IGR*: círculos blancos) en células BHK-21 a un moi de 0,01. El sobrenadante se recogió en los puntos de tiempo indicados después de la infección y las titulaciones virales se determinaron mediante un ensayo de formación de foco. Los símbolos y las barras representan la media \pm SEM de tres réplicas por grupo. Se muestran datos representativos de uno de los dos experimentos independientes.

Figura 4: La infección persistente por r3LCMV-GFP^{nat} pero no r3LCMV-GFP^{art} en ratones inmunodeficientes alcanza niveles de viremia equivalentes al virus bisegmentado de tipo salvaje y da como resultado la pérdida de la expresión de GFP. (A) Los ratones AGRAG se infectaron por vía intravenosa con 1×10^4 PFU de r3LCMV-GFP^{nat} (círculos negros), r3LCMV-GFP^{art} (cuadrados blancos) o r2LCMV control bisegmentado (triángulos grises) y la viremia se monitorizó en el tiempo. Los símbolos representan la media \pm SEM de 3-7 ratones por grupo. (B) Se muestra la viremia por LCMV el día 127 después de la infección intravenosa de ratones AGRAG con 1×10^4 PFU de r3LCMV-GFP^{nat} o r3LCMV-GFP^{art}. Se realizaron ensayos de inmunofoco para detectar la nucleoproteína NP (círculos grises) o GFP

(círculos blancos). Los símbolos representan ratones individuales. ns.: no estadísticamente significativo ($p \geq 0,05$); ***: $p < 0,001$ (ensayo de la t de student de dos colas no emparejado). (C-E) Se analizó la sangre de ratones AGRAG infectados con r3LCMV-GFP^{nat}, r3LCMV-GFP^{art} o r2LCMV en el día 120 después de la infección por citometría de flujo para detectar la presencia de células GFP+. Los monocitos y los macrófagos se identificaron utilizando la estrategia de activación descrita en (C). Un gráfico representativo de FACS para cada grupo y una superposición de histograma representativo de la expresión de GFP se muestra en (D). (E) Cuantificación de la población de GFP+ dentro de la población de monocitos/macrófagos CD11b+ GR1. Los símbolos representan ratones individuales.

Figura 5: La infección persistente por r3LCMV-GFP^{nat} de ratones da como resultado la recombinación del segmento S y la pérdida de transgenes funcionales de longitud completa. El ARN viral se aisló del suero de ratones AGRAG el día 127 después de la infección intravenosa con 1×10^4 PFU de r3LCMV-GFP^{nat} o r3LCMV-GFP^{art}. El ARN viral se transcribió inversamente y el ADNc que portaba tanto secuencias NP como GP se amplificó por PCR con cebadores específicos de gen apropiados. (A) Electroforesis de ADN de productos de PCR obtenidos después de (+ RT, carriles 1-8) o sin transcripción inversa previa del molde de ARN (-RT, control negativo, carriles 9-12). El suero de un animal sin tratar se usó como un control negativo separado (n, carril 8) y un ADN plasmídico que codifica un segmento S de LCMV de tipo salvaje como control positivo (p, carril 17). Los amplicones de los carriles 1-3 se sometieron a la secuenciación de Sanger. (B) Secuencia representativa de ADNc obtenida del animal n° 3 (r3LCMV-GFP^{nat} # 3) revelando un segmento S recombinado que combina secuencias de NP y GP, dos IGR (negrita) y una porción de GFP C-terminal (resaltado en gris) (SEQ ID NO: 17). (C) Esquema de tres secuencias del segmento S viral recombinadas aisladas el día 127 después de la infección, cada una de las cuales domina la población viral en un ratón AGRAG representativo. La IGR etiquetada que se origina del segmento S portador de NP está marcada con una estrella (*). La cadena que se ha secuenciado se indica mediante una flecha doble (<-->). Las indicaciones de longitud de pares de bases (pb) describen los elementos IGR remanentes y truncados (acortados) anteriores de GFP.

Figura 6: La cinética de crecimiento del virus recombinado con dos IGR en el segmento S es similar al virus bisegmentado. Las células BHK-21 se infectaron a una moi de 0,01 con LCMV bisegmentado (triángulos grises) que portaba un segmento S de tipo salvaje, con r3LCMV-GFP^{nat} trisegmentado (círculos negros) o con r2LCMV_2IGR (diamantes blancos) que porta un segmento S correspondiente al producto de recombinación recuperado de un ratón AGRAG infectado (compárese con la Fig. 5). El sobrenadante se tomó en los puntos de tiempo indicados y las titulaciones virales se determinaron por ensayo de formación de foco. Los símbolos y las barras representan la media \pm SEM de tres réplicas por grupo. Las barras de error y están ocultas en el tamaño del símbolo. ns.: no estadísticamente significativo ($p \geq 0,05$); ***: $p < 0,001$ (ANOVA de 1 vía seguido de la prueba posterior de Bonferroni para comparaciones múltiples).

Figura 7: Modelo para los eventos de recombinación responsables de la pérdida transgénica de r3LCMV-GP^{nat} y mecanismo postulado de la estabilidad genética de r3LCMV-GP^{art}. Este modelo se basa en los datos de secuencia de la terminación de la transcripción de LCMV (Meyer y Southern, 1993, J Virol, 67 (5): 2621-2627) combinado con evidencia genética inversa para la IGR como señal de terminación de la transcripción (Pinschewer *et al.*, 2005, J Virol, 79 (7): 4519-4526). Conjuntamente, estos hallazgos sugirieron una pausa de polimerasa dependiente de la estructura al completar la estructura de horquilla de la IGR. Se encontró que el remanente de GFP entre los dos IGR en segmentos S recombinados se originó a partir de uno o ambos segmentos S, fomentando el modelo de que el cambio de molde de la polimerasa (también conocido como elección de copia) ocurrió cuando la polimerasa se detuvo, ya sea durante la síntesis del genoma o del antígeno (debajo los escenarios A y B, respectivamente). (A) Durante la síntesis de antígeno, la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) se inicia en la 3'UTR de un molde de segmento S genómico y luego lee a través de ORF de NP e IGR. Al final de la IGR, la polimerasa se detiene debido a la estructura secundaria ("pausa de polimerasa dependiente de la estructura"). El bloqueo de la polimerasa facilita la elección de copia y la continuación de la replicación de ARN en un molde alternativo (aquí: genoma del segmento S que codifica GP). El cambio de molde debe ocurrir en 5' del codón de parada GP, y aparentemente es más probable que apunte a secuencias cercanas a o en la base de la horquilla IGR. Continuando su lectura a través del extremo C de la segunda GFP del molde, la polimerasa sintetiza una segunda IGR, el ORF de GP y la 5'UTR. (B) Durante la síntesis del genoma, la RdRp inicia la síntesis del ARN en el extremo 3' de un molde de segmento S antígenico que contiene GP, sintetiza la 5'UTR, GP y la mayoría o la totalidad de la IGR, seguido de una pausa de la polimerasa dependiente de la estructura. Se produce la elección de copia, cambiando en la porción C-terminal del ORF de GFP cerca de la IGR de un segmento S que contiene NP. Por lo tanto, la replicación añade un fragmento de GFP, seguido de un IGR de longitud completa, la NP y 3'UTR. (C - D) El cambio de molde de manera análoga a los escenarios (A) y (B) también puede ocurrir durante la síntesis del genoma o antígeno de r3LCMV-GFP^{art}. Este proceso también puede combinar los ORF de NP y GP en un segmento de ARN. Sin embargo, este último está compuesto por dos 3' UTR en lugar de una 3'UTR y una 5'UTR, que solo juntos forman un promotor viral funcional. Por lo tanto, tales moléculas no pueden ser amplificadas por la RdRp y, por lo tanto, no forman virus recombinados competentes para la replicación.

Figura 8: Se generó un vector de vacuna de r3LCMV-OVA^{art} con una organización del genoma análoga a r3LCMV-GFP^{art} (ver Fig. 1C) pero con dos genes de ovoalbúmina (OVA) en lugar de los genes GFP respectivos en el último virus. Los ratones C57BL/6 se inmunizaron por vía intramuscular (i.m.) con 10^4 PFU de r3LCMV-OVA^{art} o con 108 partículas de un vector basado en adenovirus 5 delecionado en E1 deficiente para la replicación que expresa OVA. 8 días después, los animales fueron sacrificados y se analizó la respuesta de células T incitada en respuesta a la vacunación. A: La frecuencia de células T CD8+ específicas de OVA en el bazo se determinó usando tetrámeros MHC clase I cargados con péptido SIINFEKL. Las frecuencias celulares específicas del epítipo se determinaron entre

linfocitos CD8+ negativos para B220. B: La funcionalidad de las células T CD8+ específicas de OVA se analizó mediante ensayos de citoquinas intracelulares utilizando el péptido SIINFEKL para la reestimulación. Las barras representan la media \pm SEM de cinco ratones por grupo. *: $p < 0,05$; **: $p > 0,01$ por el ensayo de la *t* de Student de dos colas sin emparejar.

5 Figura 9: LCMV trisegmentado induce a las células T CD8+ de memoria polifuncionales. Se infectaron ratones C57BL/6 i.v. con 1×10^5 PFU de r3LCMV-OVA o 1×10^8 PFU de rAd-OVA. Se tomaron los bazos 25 días después de la infección y se analizó la funcionalidad de las células T CD8+ específicas de OVA mediante tinción intracelular de citoquinas. El perfil de citoquinas (IFN- γ , TNF- α e IL-2) de las células T específicas de OVA inducidas por r3LCMV-OVA (barras negras) o rAd-OVA (barras blancas) se muestra como porcentaje de células T CD8+ (A) o como números absolutos por bazo (B). Los símbolos y las barras representan la media \pm SEM de cinco ratones por grupo. Se usó el ensayo de la *t* de student de dos colas sin emparejar para el análisis estadístico, los valores de *p* resultantes se corrigieron para comparaciones múltiples por multiplicación con el número de comparaciones ($n = 7$). Se muestra un experimento representativo de dos experimentos similares.

15 Figura 10: El LCMV que codifica el antígeno induce respuestas específicas de células T frente a antígenos extraños y autoantígenos. Se infectaron ratones C57BL/6 i.v. con 1×10^5 PFU de r3LCMV que codifica péptido Her2 de rata, humano o ratón (A, B y C, respectivamente). Se tomaron los bazos nueve días después de la infección y se analizó la inducción de células T CD8+ específicas de antígeno funcionales mediante tinción de citoquinas intracelulares y citometría de flujo. El perfil de citoquinas (IFN- γ , TNF- α e IL-2) de células T CD8+ específicas de Her2 inducidas por r3LCMV se muestra en % de células T CD8+. Los símbolos y las barras representan la media \pm SEM de tres ratones por grupo.

20 Figura 11: El interferón- α se induce después de la infección por r3LCMV pero no después de la infección con Adenovirus o Vacciniavirus recombinante. Se infectaron ratones C57BL/6 i.v. con 1×10^5 PFU de r3LCMV-OVA, 1×10^8 PFU de rAd-OVA o 1×10^6 de PFU rVacc-OVA. Se recogió sangre en los puntos de tiempo indicados después de la infección y se determinaron los niveles de interferón- α en el suero mediante ELISA. Los símbolos y las barras representan la media \pm SEM de cuatro ratones por grupo. ***: $p < 0,001$ (ANOVA de 2 vías seguido de la prueba posterior de Bonferroni para comparaciones múltiples). Se muestran datos representativos de uno de dos experimentos independientes.

25 Figura 12: Crecimiento del cultivo celular de r3JUNV-GFP^{art} en comparación con r3JUNV-GFP^{nat} y r2JUNV-wt. r3JUNV-GFP^{art} y r3JUNV-GFP^{nat} se construyeron de forma análoga a los respectivos vectores de r3LCMV mostrados esquemáticamente en la Figura 1. Para comparar sus propiedades en el crecimiento del cultivo celular, se infectaron células 293T a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,01 con r2LCMV-wt, r3JUNV-GFP^{art} y r3JUNV-GFP^{nat}, y el sobrenadante se recogió en los puntos de tiempo indicados. Las unidades infecciosas (FFU) en el sobrenadante se determinaron por ensayo de inmunofoco. Los símbolos y las barras representan la media \pm SEM de tres réplicas por grupo y están ocultos en el tamaño del símbolo.

30 Figura 13: Los JUNV trisegmentados se atenúan dramáticamente in vivo y solo conducen a una viremia detectable tras la pérdida de GFP. (A) Los ratones AGRAG se infectaron i.v. con 7×10^4 PFU de r3JUNV-GFP^{nat} (cuadrados grises), r3JUNV-GFP^{art} (triángulos blancos) o cepa r2JUNV bisegmentada control Candid# 1 (círculos negros), y la viremia se monitorizó con el tiempo. Los símbolos representan ratones individuales ($n = 3-7$ por grupo). (B) La viremia de JUNV se determinó el día 120 después de la infección intravenosa de ratones AGRAG con 7×10^4 PFU de r3JUNV-GFP^{nat} o r3JUNV-GFP^{art}. Se realizaron ensayos de inmunofoco para detectar la nucleoproteína NP (círculos grises) o GFP (círculos blancos). Las preparaciones madre virales usadas para inocular los ratones se usaron como control de tinción en el ensayo. Los símbolos representan ratones e inóculos individuales, respectivamente.

35 Figura 14: Las combinaciones homólogas y heterólogas de sensibilización y refuerzo de vectores de vacunas basados en LCMV y JUNV trisegmentados inducen fuertes respuestas de células T CD8+ específicas de autoantígeno P1A. (A) El día 0 y 35 del experimento, los ratones BALB/c fueron inmunizados con $8,5 \times 10^4$ PFU de r3JUNV-P1A^{art} (r3JUNV-P1A) y r3LCMV-P1A^{art} (r3LCMV-P1A) por vía intravenosa en las combinaciones homólogas o heterólogas indicadas en la gráfica. Las células T CD8+ específicas de epítipo se tiñeron usando tetrámeros MHC clase I cargados con epítipo P1A en combinación con anticuerpo anti-CD8a. Se calculó la frecuencia de células que se unen a tetrámero P1A dentro del compartimento de células T CD8+ en sangre periférica (A) y el número absoluto de células T CD8+ que se unen a tetrámero P1A por microlitro de sangre periférica (B). Los símbolos representan la media \pm SEM de 3-5 ratones por grupo y punto de tiempo.

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona una partícula de arenavirus infecciosa trisegmentada y competente para la replicación que comprende un segmento L y dos segmentos S, en donde uno de los dos segmentos S se selecciona del grupo que consiste en:

- (i) un segmento S, en donde el ORF que codifica la NP está bajo el control de una 5' UTR de arenavirus;
- (ii) un segmento S, en donde el ORF que codifica la proteína Z está bajo el control de una 5' UTR de arenavirus;

- (iii) un segmento S, en donde el ORF que codifica la proteína L está bajo el control de una 5' UTR de arnavirus;
- (iv) un segmento S, en donde el ORF que codifica la GP está bajo el control de una 3' UTR de arnavirus;
- (v) un segmento S, en donde el ORF que codifica el L está bajo el control de una 3' UTR de arnavirus; y
- (vi) un segmento S, en donde el ORF que codifica la proteína Z está bajo el control de una 3' UTR de arnavirus,

5 en donde la partícula de virus trisegmentada comprende dos ORF heterólogos.

La invención proporciona una partícula de arnavirus infecciosa trisegmentada y competente para la replicación que comprende dos segmentos L y un segmento S, en donde uno de los dos segmentos L se selecciona del grupo que consiste en:

- (i) un segmento L, en donde el ORF que codifica la GP está bajo el control de una 5' UTR de arnavirus;
- 10 (ii) un segmento L, en donde el ORF que codifica el NP está bajo el control de una 5' UTR de arnavirus;
- (iii) un segmento L, en donde el ORF que codifica la proteína L está bajo el control de una 5' UTR de arnavirus;
- (iv) un segmento L, en donde el ORF que codifica la GP está bajo el control de una 3' UTR de arnavirus;
- (v) un segmento L, en donde el ORF que codifica la NP está bajo el control de una 3' UTR de arnavirus; y
- (vi) un segmento L, en donde el ORF que codifica la proteína Z está bajo el control de una 3' UTR de arnavirus,

15 en donde la partícula de virus trisegmentada comprende dos ORF heterólogos.

Además, la invención proporciona un ADNc del genoma de la partícula de arnavirus trisegmentada de la invención. La invención también proporciona un vector de expresión de ADN que comprende el ADNc.

Además, la invención proporciona una célula huésped que comprende la partícula de arnavirus trisegmentada, el ADNc o el vector de la invención.

20 Además, la invención proporciona un método para generar la partícula de arnavirus trisegmentada de la invención, en donde el método comprende:

- (i) transfectar en una célula huésped uno o más ADNc de un segmento L y dos segmentos S;
- (ii) mantener la célula huésped en condiciones adecuadas para la formación de virus; y
- (iii) recoger la partícula de arnavirus.

25 Además, la invención proporciona un método para generar la partícula de arnavirus trisegmentada de la invención, en donde el método comprende:

- (i) transfectar en una célula huésped uno o más ADNc de los dos segmentos L y un segmento S;
- (ii) mantener la célula huésped en condiciones adecuadas para la formación de virus; y
- (iii) recoger la partícula de arnavirus.

30 Además, la invención proporciona una vacuna que comprende una partícula de arnavirus trisegmentada de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Finalmente, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una partícula de arnavirus trisegmentada de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

4.1 Arnavirus con un marco de lectura abierto en una posición no natural

35 En la presente memoria se proporcionan arnavirus con reordenamientos de sus ORF. En ciertas realizaciones, tales arnavirus son competentes para la replicación e infecciosos. Las secuencias genómicas de tales arnavirus se proporcionan en la presente memoria. En un aspecto, en la presente memoria se proporciona un segmento genómico de arnavirus, en donde el segmento genómico de arnavirus está preparado por ingeniería para portar un ORF de arnavirus en una posición distinta de la posición en la que se encuentra el gen respectivo en virus aislados de la naturaleza, tales como LCMV-MP (véanse las SEQ ID NO: 4 y 5) (denominado en la presente memoria "posición de tipo salvaje") del ORF (es decir, una posición no natural). En una realización, la partícula de arnavirus es un LCMV.

40

Los segmentos genómicos de arnavirus de tipo salvaje y los ORF se conocen en la técnica. En particular, el genoma del arnavirus consiste en un segmento S y un segmento L. El segmento S porta los ORF que codifican la GP y la NP. El segmento L codifica la proteína L y la proteína Z. Ambos segmentos están flanqueados por las respectivas UTR en

5' y 3' (véase la Figura 1A). Los segmentos genómicos de arnavirus de tipo salvaje ilustrativos se proporcionan en las SEQ ID NO: 1-10.

5 En ciertas realizaciones, un segmento genómico de arnavirus se puede preparar por ingeniería para portar dos o más ORF de arnavirus en una posición distinta de la posición de tipo salvaje. En otras realizaciones, el segmento genómico de arnavirus se puede preparar por ingeniería para portar dos ORF de arnavirus, o tres ORF de arnavirus, o cuatro ORF de arnavirus en una posición distinta de la posición de tipo salvaje.

En ciertas realizaciones, un segmento genómico de arnavirus puede ser:

- (i) un segmento S de arnavirus, en donde el ORF que codifica el NP está bajo el control de una 5' UTR de arnavirus;
- 10 (ii) un segmento S de arnavirus, en donde el ORF que codifica la proteína Z está bajo el control de una 5' UTR de arnavirus;
- (iii) un segmento S de arnavirus, en donde el ORF que codifica la proteína L está bajo el control de una 5' UTR de arnavirus;
- (iv) un segmento S de arnavirus S, en donde el ORF que codifica el GP está bajo el control de una 3' UTR de arnavirus;
- 15 (v) un segmento S de arnavirus S, en donde el ORF que codifica la proteína L está bajo el control de una 3' UTR de arnavirus;
- (vi) un segmento S de arnavirus, en donde el ORF que codifica la proteína Z está bajo el control de una 3' UTR de arnavirus;
- (vii) un segmento L de arnavirus, en donde el ORF que codifica el GP está bajo el control de una 5' UTR de arnavirus;
- 20 (viii) un segmento L de arnavirus, en donde el ORF que codifica el NP está bajo el control de una 5' UTR de arnavirus;
- (ix) un segmento L de arnavirus, en donde el ORF que codifica la proteína L está bajo el control de una 5' UTR de arnavirus;
- (x) un segmento L de arnavirus, en donde el ORF que codifica el GP está bajo el control de una 3' UTR de arnavirus;
- 25 (xi) un segmento L de arnavirus, en donde el ORF que codifica el NP está bajo el control de una 3' UTR de arnavirus;
- y
- (xii) un segmento L de arnavirus, en donde el ORF que codifica la proteína Z está bajo el control de una 3' UTR de arnavirus.

30 En ciertas realizaciones, el ORF que está en la posición no natural del segmento genómico de arnavirus descrito en la presente memoria puede estar bajo el control de una 3' UTR de arnavirus o una 5' UTR de arnavirus. En realizaciones más específicas, la 3' UTR de arnavirus es la 3' UTR del segmento S de arnavirus. En otra realización específica, la 3' UTR de arnavirus es la 3' UTR del segmento L de arnavirus. En realizaciones más específicas, la 5' UTR de arnavirus es la 5' UTR del segmento S de arnavirus. En otras realizaciones específicas, la 5' UTR es la 5' UTR del segmento L.

35 En otras realizaciones, el ORF que está en la posición no natural del segmento genómico de arnavirus descrito en la presente memoria puede estar bajo el control del elemento de secuencia terminal conservado de arnavirus (las regiones 5' y 3' terminales de 19-20-nt) (véase, p. ej., Pérez y de la Torre, 2003, *J Virol.* 77 (2): 1184-1194).

40 En ciertas realizaciones, el ORF que está en la posición no natural del segmento genómico de arnavirus puede estar bajo el control del elemento promotor de la 5' UTR (véase, p. ej., Albarino *et al.*, 2011, *J Virol.*, 85 (8): 4020-4). En otra realización, el ORF que está en la posición no natural del segmento genómico de arnavirus puede estar bajo el control del elemento promotor de la 3' UTR (véase, p. ej., Albarino *et al.*, 2011, *J Virol.*, 85 (8): 4020-4). En realizaciones más específicas, el elemento promotor de la 5' UTR es el elemento promotor 5' UTR del segmento S o el segmento L. En otra realización específica, el elemento promotor de la 3' UTR es el elemento promotor 3' UTR del segmento S o el segmento L.

45 En ciertas realizaciones, el ORF que está en la posición no natural del segmento genómico de arnavirus puede estar bajo el control de una 3' UTR de arnavirus truncada o una 5' UTR de arnavirus truncada (véase, p. ej., Pérez y de la Torre, 2003, *J Virol.* 77 (2): 1184-1194; Albarino *et al.*, 2011, *J Virol.*, 85 (8): 4020-4). En realizaciones más específicas, la 3' UTR truncada es la 3' UTR del segmento S o segmento L de arnavirus. En realizaciones más específicas, la 5' UTR truncada es la 5' UTR del segmento S o segmento L de arnavirus.

50 También se describe en la presente memoria, una partícula de arnavirus que comprende un primer segmento genómico que ha sido preparado por ingeniería para portar un ORF en una posición distinta de la posición de tipo

salvaje del ORF y un segundo segmento genómico de arenavirus de modo que la partícula de arenavirus comprenda un segmento S y un segmento L. En ejemplos específicos, el ORF en una posición distinta de la posición de tipo salvaje del ORF es uno de los ORF de arenavirus.

5 En ciertos ejemplos específicos, la partícula de arenavirus puede comprender un complemento completo de los cuatro ORF de arenavirus. En ejemplos específicos, el segundo segmento genómico de arenavirus ha sido preparado por ingeniería para portar un ORF en una posición distinta de la posición de tipo salvaje del ORF. En otros ejemplos específicos, el segundo segmento genómico de arenavirus puede ser el segmento genómico de tipo salvaje (es decir, comprende los ORF en el segmento en la posición de tipo salvaje).

10 En ciertos ejemplos, el primer segmento genómico de arenavirus es un segmento L y el segundo segmento genómico de arenavirus es un segmento S. En otros ejemplos, el primer segmento genómico de arenavirus es un segmento S y el segundo segmento genómico de arenavirus es un segmento L.

En la Tabla 1 se ilustran ejemplos no limitantes de la partícula de arenavirus que comprende un segmento genómico con un ORF en una posición distinta de la posición de tipo salvaje del ORF y un segundo segmento genómico.

Tabla 1

15 Partícula de arenavirus

* La posición 1 está bajo el control de una 5' UTR del segmento S de arenavirus; La posición 2 está bajo el control de una 3' UTR del segmento S de arenavirus; La posición 3 está bajo el control de una 5' UTR del segmento L de arenavirus; La posición 4 está bajo el control de una 3' UTR del segmento L de arenavirus.

Posición 1	Posición 2	Posición 3	Posición 4
GP	NP	L	Z
GP	Z	L	NP
GP	Z	NP	L
GP	L	NP	Z
GP	L	Z	NP
NP	GP	L	Z
NP	GP	Z	L
NP	L	GP	Z
NP	L	Z	GP
NP	Z	GP	L
NP	Z	L	GP
Z	GP	L	NP
Z	GP	NP	L
Z	NP	GP	L
Z	NP	L	GP
Z	L	NP	GP
Z	L	GP	NP

Posición 1	Posición 2	Posición 3	Posición 4
L	NP	GP	Z
L	NP	Z	GP
L	GP	Z	NP
L	GP	NP	Z
L	Z	NP	GP
L	Z	GP	NP

5 También se describe en la presente memoria, un ADNc del segmento genómico de arnavirus preparado por ingeniería para portar un ORF en una posición distinta de la posición de tipo salvaje del ORF. En ejemplos más específicos, se describe en la presente memoria un ADNc o un conjunto de ADNc de un genoma de arnavirus como se expone en la Tabla 1.

10 En ciertas realizaciones, un ADNc del segmento genómico de arnavirus que está preparado por ingeniería para portar un ORF en una posición distinta de la posición de tipo salvaje del ORF forma parte o está incorporado en un vector de expresión de ADN. En una realización específica, un ADNc del segmento genómico de arnavirus que está preparado por ingeniería para portar un ORF en una posición distinta de la posición de tipo salvaje del ORF forma parte o está incorporado en un vector de expresión de ADN que facilita la producción de un segmento genómico de arnavirus como se describe en la presente memoria. En otra realización, un ADNc descrito en la presente memoria puede incorporarse en un plásmido. Se proporciona una descripción más detallada de los ADNc o ácidos nucleicos y sistemas de expresión en la Sección 4.5.1. Las técnicas para la producción de un ADNc son técnicas rutinarias y convencionales de biología molecular y manipulación y producción de ADN. Se puede usar cualquier técnica de clonación conocida por el experto en la técnica. Tales técnicas son bien conocidas y están disponibles para el experto en la técnica en manuales de laboratorio tales como, Sambrook y Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory N.Y. (2001)).

20 En ciertas realizaciones, se introduce (p.ej., se transfecta) el ADNc del segmento genómico de arnavirus que está preparado por ingeniería para portar un ORF en una posición distinta de la posición de tipo salvaje del ORF en una célula huésped. Por lo tanto, en algunas realizaciones proporcionadas en la presente memoria, es una célula huésped que comprende un ADNc del segmento genómico de arnavirus que está preparado por ingeniería para portar un ORF en una posición distinta de la posición de tipo salvaje del ORF (es decir, un ADNc del segmento genómico). En otras realizaciones, el ADNc descrito en la presente memoria forma parte o puede incorporarse en un vector de expresión de ADN e introducirse en una célula huésped. Por lo tanto, en algunas realizaciones proporcionadas en la presente memoria es una célula huésped que comprende un ADNc descrito en la presente memoria que se incorpora en un vector. En otras realizaciones, el segmento genómico de arnavirus descrito en la presente memoria se introduce en una célula huésped.

30 En ciertas realizaciones, en la presente memoria se describe un método para producir el segmento genómico de arnavirus, en donde el método comprende transcribir el ADNc del segmento genómico de arnavirus. En ciertas realizaciones, una proteína polimerasa viral puede estar presente durante la transcripción del segmento genómico de arnavirus *in vitro* o *en vivo*.

35 En ciertas realizaciones, la transcripción del segmento genómico de arnavirus se realiza usando un promotor bidireccional. En otras realizaciones, la transcripción del segmento genómico de arnavirus se realiza usando un casete de expresión bidireccional (véase, p. ej., Ortiz-Riaño *et al.*, 2013, *J Gen Virol.*, 94 (Pt 6): 1175-1188). En realizaciones más específicas, el casete de expresión bidireccional comprende tanto un promotor de polimerasa I como de polimerasa II que leen desde lados opuestos en los dos extremos del segmento genómico de arnavirus insertado, respectivamente. En realizaciones aún más específicas, el casete de expresión bidireccional con promotores de pol-I y pol-II lee desde lados opuestos en el segmento L y el segmento S.

40 En otras realizaciones, la transcripción del ADNc del segmento genómico de arnavirus descrito en la presente memoria comprende un promotor. Los ejemplos específicos de promotores incluyen un promotor de ARN polimerasa I, un promotor de ARN polimerasa II, un promotor de ARN polimerasa III, un promotor T7, un promotor SP6 o un promotor T3.

En ciertas realizaciones, el método para producir el segmento genómico de arnavirus puede comprender además introducir en una célula huésped el ADNc del segmento genómico de arnavirus. En ciertas realizaciones, el método

para producir el segmento genómico de arnavirus puede comprender además introducir en una célula huésped el ADNc del segmento genómico de arnavirus, en donde la célula huésped expresa todos los demás componentes para la producción del segmento genómico de arnavirus; y purificar el segmento genómico de arnavirus del sobrenadante de la célula huésped. Dichos métodos son bien conocidos por los expertos en la técnica.

- 5 En la presente memoria se proporcionan líneas celulares, cultivos y métodos de cultivo de células infectadas con ácidos nucleicos, vectores y composiciones proporcionadas en la presente memoria. Una descripción más detallada de los ácidos nucleicos, sistemas de vectores y líneas celulares descritas en la presente memoria se proporciona en la Sección 4.5.

- 10 En ciertas realizaciones, la partícula de arnavirus como se describe en la presente memoria da como resultado una partícula de arnavirus infecciosa y competente para la replicación. En realizaciones específicas, la partícula de arnavirus descrita en la presente memoria está atenuada. En una realización particular, la partícula de arnavirus se atenúa de manera que el virus permanece, al menos parcialmente, capaz de diseminarse y puede replicarse *in vivo*, pero solo puede generar bajas cargas virales que dan lugar a niveles subclínicos de infección que no son patógenos. Tales virus atenuados pueden usarse como una composición inmunogénica. En la presente memoria, se proporcionan composiciones inmunogénicas que comprenden un arnavirus con un ORF en una posición no natural como se describe en la Sección 4.7.

4.1.1 Partículas de Arnavirus deficientes para la replicación con un marco de lectura abierto en una posición no natural

- 20 En ciertos ejemplos, en la presente memoria se describe una partícula de arnavirus en la que (i) un ORF está en una posición distinta de la posición de tipo salvaje del ORF; y (ii) un ORF que codifica GP, NP, la proteína Z y la proteína L se ha eliminado o se ha inactivado funcionalmente de manera que el virus resultante no puede producir más partículas de virus de la progenie infecciosas. Una partícula de arnavirus que comprende un genoma modificado genéticamente en donde uno o más ORF se ha eliminado o inactivado funcionalmente se puede producir en células complementarias (es decir, células que expresan el arnavirus ORF que ha sido eliminado o inactivado funcionalmente). El material genético de la partícula de arnavirus resultante puede transferirse tras la infección de una célula huésped en la célula huésped, en donde el material genético puede expresarse y amplificarse. Además, el genoma de la partícula de arnavirus modificada genéticamente descrita en la presente memoria puede codificar un ORF heterólogo de un organismo distinto de una partícula de arnavirus.

- 30 En ciertos ejemplos, al menos uno de los cuatro ORF que codifican GP, NP, la proteína Z y la proteína L se elimina y se reemplaza con un ORF heterólogo de un organismo que no sea un arnavirus. En otro ejemplo, al menos un ORF, al menos dos ORF, al menos tres ORF, o al menos cuatro ORF que codifican GP, NP, proteína Z y proteína L pueden eliminarse y reemplazarse con un ORF heterólogo de un organismo que no sea un arnavirus. En ejemplos específicos, solo uno de los cuatro ORF que codifican GP, NP, la proteína Z y la proteína L se elimina y reemplaza con un ORF heterólogo de un organismo que no sea una partícula de arnavirus. En ejemplos más específicos, se elimina el ORF que codifica GP del segmento genómico de arnavirus. En otro ejemplo específico, se elimina el ORF que codifica la NP del segmento genómico de arnavirus. En ejemplos más específicos, se elimina el ORF que codifica la proteína Z del segmento genómico de arnavirus. En otro ejemplo específico más, se elimina el ORF que codifica la proteína L.

- 40 Por lo tanto, en ciertos ejemplos, la partícula de arnavirus descrita en la presente memoria comprende un segmento genómico que (i) está preparado por ingeniería para portar un ORF en una posición no natural; (ii) se elimina un ORF que codifica GP, NP, la proteína Z o la proteína L; (iii) el ORF que se elimina se reemplaza con un ORF heterólogo de un organismo que no sea un arnavirus.

- 45 En ciertos ejemplos, el ORF heterólogo tiene una longitud de 8 a 100 nucleótidos, una longitud de 15 a 100 nucleótidos, una longitud de 25 a 100 nucleótidos, una longitud de 50 a 200 nucleótidos, una longitud de 50 a 400 nucleótidos, una longitud de 200 a 500 nucleótidos, o una longitud de 400 a 600 , una longitud de 500 a 800 nucleótidos. En otros ejemplos, el ORF heterólogo tiene una longitud de 750 a 900 nucleótidos, una longitud de 800 a 1000 nucleótidos, una longitud de 850 a 1.000 nucleótidos, una longitud de 900 a 1.200 nucleótidos, una longitud de 1.000 a 1.200 nucleótidos, una longitud de 1.000 a 1.500 nucleótidos o una longitud de 10 a 1.500 nucleótidos, una longitud de 1.500 a 2.000 nucleótidos, una longitud de 1.700 a 2.000 nucleótidos, una longitud de 2.000 a 2.300 nucleótidos, una longitud de 2.200 a 2.500 nucleótidos, una longitud de 2.500 a 3.000 nucleótidos, una longitud de 3.000 a 3.200 nucleótidos, una longitud de 3.000 a 3.500 nucleótidos, una longitud de 3.200 a 3.600 nucleótidos, una longitud de 3.300 a 3.800 nucleótidos, una longitud de 4.000 nucleótidos a 4.400 nucleótidos, una longitud de 4.200 a 4.700 nucleótidos, una longitud de 4.800 a 5.000 nucleótidos, una longitud de 5.000 a 5.200 nucleótidos, una longitud de 5.200 a 5.500 nucleótidos, una longitud de 5.500 a 5.800 nucleótidos, una longitud de 5.800 a 6.000 nucleótidos, una longitud de 6.000 a 6.400 nucleótidos, una longitud de 6.200 a 6.800 nucleótidos, una longitud de 6.600 a 7.000 nucleótidos, una longitud de 7.000 a 7.200 nucleótidos, una longitud de 7.200 a 7.500 nucleótidos, o una longitud de 7.500 nucleótidos. En algunos ejemplos, el ORF heterólogo codifica un péptido o polipéptido que tiene una longitud de 5 a 10 aminoácidos, una longitud de 10 a 25 aminoácidos, una longitud de 25 a 50 aminoácidos, una longitud de 50 a 100 aminoácidos, una longitud de 100 a 150 aminoácidos, una longitud de 150 a 200 aminoácidos, una longitud de 200 a 250 aminoácidos, una longitud de 250 a 300 aminoácidos, una longitud de 300 a 400 aminoácidos, una longitud de

400 a 500 aminoácidos, una longitud de 500 a 750 aminoácidos, una longitud de 750 a 1.000 aminoácidos, una longitud de 1.000 a 1.250 aminoácidos, una longitud de 1.250 a 1.500 aminoácidos, una longitud de 1.500 a 1.750 aminoácidos, una longitud de 1.750 a 2.000 aminoácidos, una longitud de 2.000 a 2.500 aminoácidos, o una longitud de más de 2.500 o más aminoácidos. En algunos ejemplos, el ORF heterólogo codifica un polipéptido que no excede una longitud de 2.500 aminoácidos. En ejemplos específicos, el ORF heterólogo no contiene un codón de parada. En ciertos ejemplos, el ORF heterólogo está optimizado por codones. En ciertos ejemplos, la composición de nucleótidos, la composición de pares de nucleótidos o ambas pueden optimizarse. Las técnicas para tales optimizaciones son conocidas en la técnica y pueden aplicarse para optimizar un ORF heterólogo.

Cualquier ORF heterólogo de un organismo que no sea un arnavirus puede incluirse en un segmento genómico de arnavirus. En un ejemplo, el ORF heterólogo codifica una proteína informadora. Una descripción más detallada de las proteínas informadoras se describe en la Sección 4.3. En otro ejemplo, el ORF heterólogo codifica un antígeno para un patógeno infeccioso o un antígeno asociado con cualquier enfermedad que sea capaz de incitar una respuesta inmune. En ejemplos específicos, el antígeno se deriva de un organismo infeccioso, un tumor (es decir, cáncer) o un alérgeno. Una descripción más detallada sobre los ORF heterólogos se describe en la Sección 4.3.

En ciertos ejemplos, el crecimiento y la infectividad de la partícula de arnavirus no se ven afectados por el ORF heterólogo de un organismo que no sea un arnavirus.

Las técnicas conocidas por un experto en la técnica pueden usarse para producir una partícula de arnavirus que comprende un segmento genómico de arnavirus preparado por ingeniería para portar un ORF de arnavirus en una posición distinta de la posición de tipo salvaje. Por ejemplo, pueden usarse técnicas de genética inversa para generar dicha partícula de arnavirus. En otros ejemplos, la partícula de arnavirus deficiente para la replicación (es decir, el segmento genómico de arnavirus preparado por ingeniería para portar un ORF de arnavirus en una posición distinta de la posición de tipo salvaje, en la que se ha delecionado un ORF que codifica GP, NP, la proteína Z, la proteína L) en una célula complementaria.

En ciertos ejemplos, el segmento genómico de arnavirus o la partícula de arnavirus que se usa de acuerdo con la presente solicitud puede ser Virus del Viejo Mundo, por ejemplo, LCMV.

En ciertos ejemplos, la presente solicitud se refiere a la partícula de arnavirus como se describe en la presente memoria adecuada para uso como una vacuna y a métodos para usar dicha partícula de arnavirus en una vacunación y tratamiento o prevención de, por ejemplo, infecciones o cánceres. En la Sección 4.6 se proporciona una descripción más detallada de los métodos de uso de la partícula de arnavirus descrita en la presente memoria.

En ciertos ejemplos, en la presente memoria se proporciona un kit que comprende, en uno o más contenedores, uno o más ADNc descritos en la presente memoria. En un ejemplo específico, un kit comprende, en uno o dos o más contenedores, un segmento genómico de arnavirus o una partícula de arnavirus como se describe en la presente memoria. El kit puede comprender además uno o más de los siguientes: una célula huésped adecuada para el rescate del segmento genómico de arnavirus o la partícula de arnavirus, reactivos adecuados para transfectar el ADNc del plásmido en una célula huésped, un virus auxiliar, plásmidos que codifican proteínas virales y/o uno o más cebadores específicos para un segmento genómico de arnavirus modificado o una partícula de arnavirus o ADNc del mismo.

En ciertos ejemplos, la presente solicitud se refiere a la partícula de arnavirus como se describe en la presente memoria adecuada para su uso como una composición farmacéutica y métodos para usar dicha partícula de arnavirus en una vacunación y tratamiento o prevención de, por ejemplo, infecciones y cánceres. En la Sección 4.7 se proporciona una descripción más detallada de los métodos de uso de la partícula de arnavirus descrita en la presente memoria.

4.2 Partícula de arnavirus trisegmentada

En la presente memoria se proporcionan partículas de arnavirus trisegmentadas con reordenamientos de sus ORF. En un aspecto, en la presente memoria se proporciona una partícula de arnavirus trisegmentada que comprende un segmento L y dos segmentos S o dos segmentos L y un segmento S. En ciertas realizaciones, la partícula de arnavirus trisegmentada no se recombina en una partícula de arnavirus bisegmentada competente para la replicación. Más específicamente, en ciertas realizaciones, dos de los segmentos genómicos (p. ej., los dos segmentos S o los dos segmentos L, respectivamente) no pueden recombinarse de una manera que produzca un solo segmento viral que pueda reemplazar a los dos segmentos parentales. En realizaciones específicas, la partícula de arnavirus trisegmentada comprende un ORF en una posición distinta de la posición de tipo salvaje del ORF. En otra realización específica más, la partícula de arnavirus trisegmentada comprende los cuatro ORF de arnavirus. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la partícula de arnavirus trisegmentada es competente para la replicación y es infecciosa. En otros ejemplos, la partícula de arnavirus trisegmentada carece de uno de los cuatro ORF de arnavirus. Por lo tanto, en ciertos ejemplos, la partícula de arnavirus trisegmentada es infecciosa pero no puede producir más progenie infecciosa en células no complementarias.

En ciertas realizaciones, el ORF que codifica GP, NP, la proteína Z o la proteína L de la partícula de arnavirus trisegmentada descrita en la presente memoria puede estar bajo el control de una 3' UTR de arnavirus o una 5' UTR de arnavirus. En realizaciones más específicas, la 3' UTR de arnavirus trisegmentado es la 3' UTR de un segmento

o segmentos S de arenavirus. En otra realización específica, la 3'UTR de arenavirus trisegmentado es la 3'UTR de un segmento o segmentos L de arenavirus trisegmentado. En realizaciones más específicas, la 5'UTR del arenavirus trisegmentado es la 5' UTR de un segmento o segmentos S de arenavirus. En otras realizaciones específicas, la 5' UTR es la 5' UTR del o de los segmentos L.

5 En otras realizaciones, el ORF que codifica GP, NP, la proteína Z o la proteína L de la partícula de arenavirus trisegmentada descrita en la presente memoria puede estar bajo el control del elemento de secuencia terminal conservado por arenavirus (las regiones de 19-20 nt 45' y 3' terminales) (véase, p. ej., Pérez y de la Torre, 2003, J Virol. 77 (2): 1184-1194).

10 En ciertas realizaciones, el ORF que codifica GP, NP, la proteína Z o la proteína L de la partícula de arenavirus trisegmentada puede estar bajo el control del elemento promotor de la 5' UTR (véase, p. ej., Albarino *et al.*, 2011, J Virol., 85 (8): 4020-4). En otra realización, el ORF que codifica GP, NP, la proteína Z, la proteína L de la partícula de arenavirus trisegmentada puede estar bajo el control del elemento promotor de la 3' UTR (véase, p. ej., Albarino *et al.*, 2011, J Virol., 85 (8): 4020-4). En realizaciones más específicas, el elemento promotor de la 5' UTR es el elemento promotor 5' UTR del segmento o segmentos S o el segmento o segmentos L. En otra realización específica, el elemento promotor de la 3' UTR es la 3' UTR, el elemento promotor del segmento o segmentos S o el segmento o segmentos L.

20 En ciertas realizaciones, el ORF que codifica GP, NP, la proteína Z o la proteína L de la partícula de arenavirus trisegmentada puede estar bajo el control de una 3' UTR de arenavirus truncada o una 5'UTR de arenavirus truncada (véase, p. ej., Pérez y de la Torre, 2003, J Virol. 77 (2): 1184-1194; Albarino *et al.*, 2011, J Virol., 85 (8): 4020-4). En realizaciones más específicas, la 3' UTR truncada es la 3' UTR del segmento S o segmento L de arenavirus. En realizaciones más específicas, la 5' UTR truncada es la 5' UTR del segmento o segmentos S o segmento o segmentos L de arenavirus.

25 También se proporciona en la presente memoria, un ADNc de la partícula de arenavirus trisegmentada. En realizaciones más específicas, en la presente memoria se proporciona una secuencia de nucleótidos de ADN o un conjunto de secuencias de nucleótidos de ADN que codifican una partícula de arenavirus trisegmentada como se muestra en la Tabla 2 o la Tabla 3.

30 En ciertas realizaciones, los ácidos nucleicos que codifican el genoma del arenavirus trisegmentado forman parte de o están incorporados en uno o más vectores de expresión de ADN. En una realización específica, los ácidos nucleicos que codifican el genoma de la partícula de arenavirus trisegmentada forman parte de o están incorporados en uno o más vectores de expresión de ADN que facilitan la producción de una partícula de arenavirus trisegmentada como se describe en la presente memoria. En otra realización, un ADNc descrito en la presente memoria puede incorporarse en un plásmido. En la Sección 4.5.1 se proporciona una descripción más detallada de los ADNc y los sistemas de expresión. Técnicas para la producción de un ADNc técnicas rutinarias y convencionales de biología molecular y manipulación y producción de ADN. Se puede usar cualquier técnica de clonación conocida por el experto en la técnica. Dichas técnicas son bien conocidas y están disponibles para el experto en la técnica en manuales de laboratorio tales como, Sambrook y Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory N.Y. (2001).

40 En ciertas realizaciones, el ADNc del arenavirus trisegmentado se introduce (p. ej., se transfecta) en una célula huésped. Por lo tanto, en algunas realizaciones proporcionadas en la presente memoria, es una célula huésped que comprende un ADNc de la partícula de arenavirus trisegmentada (es decir, un ADNc de los segmentos genómicos de la partícula de arenavirus trisegmentada). En otras realizaciones, el ADNc descrito en la presente memoria que forma parte de o puede incorporarse en un vector de expresión de ADN e introducirse en una célula huésped. Por lo tanto, en algunas realizaciones proporcionadas en la presente memoria es una célula huésped que comprende un ADNc descrito en la presente memoria que se incorpora en un vector. En otras realizaciones, los segmentos genómicos de arenavirus trisegmentados (es decir, el segmento L y/o el segmento o segmentos S) descritos en la presente memoria se introducen en una célula huésped.

50 En ciertas realizaciones, en la presente memoria se describe un método para producir la partícula de arenavirus trisegmentada, en donde el método comprende transcribir el ADNc de la partícula de arenavirus trisegmentada. En ciertas realizaciones, una proteína polimerasa viral puede estar presente durante la transcripción de la partícula de arenavirus trisegmentada *in vitro* o *in vivo*. En ciertas realizaciones, la transcripción del segmento genómico de arenavirus se realiza usando un promotor bidireccional.

55 En otras realizaciones, la transcripción del segmento genómico de arenavirus se realiza usando un casete de expresión bidireccional (véase, p. ej., Ortiz-Riaño *et al.*, 2013, J Gen Virol., 94 (Pt 6): 1175-1188). En realizaciones más específicas, el casete de expresión bidireccional comprende tanto un promotor de polimerasa I como de polimerasa II que leen desde lados opuestos en los dos extremos del segmento genómico de arenavirus insertado, respectivamente.

En otras realizaciones, la transcripción del ADNc del segmento genómico de arenavirus descrito en la presente memoria comprende un promotor. Los ejemplos específicos de promotores incluyen un promotor de ARN polimerasa

I, un promotor de ARN polimerasa II, un promotor de ARN polimerasa III, un promotor T7, un promotor SP6 o un promotor T3.

5 En ciertas realizaciones, el método para producir la partícula de arnavirus trisegmentada puede comprender además introducir en una célula huésped el ADNc de la partícula de arnavirus trisegmentada. En ciertas realizaciones, el método para producir la partícula de arnavirus trisegmentada puede comprender además introducir en una célula huésped el ADNc de la partícula de arnavirus trisegmentada, en donde la célula huésped expresa todos los demás componentes para la producción de la partícula de arnavirus trisegmentada; y purificar la partícula de arnavirus trisegmentada del sobrenadante de la célula huésped. Dichos métodos son bien conocidos por los expertos en la técnica.

10 En la presente memoria se proporcionan líneas celulares, cultivos y métodos de cultivo de células infectadas con ácidos nucleicos, vectores y composiciones proporcionadas en la presente memoria. En la Sección 4.5 se proporciona una descripción más detallada de los ácidos nucleicos, sistemas de vectores y líneas celulares descritas en la presente memoria.

15 En ciertas realizaciones, la partícula de arnavirus trisegmentada como se describe en la presente memoria da como resultado una partícula de arnavirus infecciosa y competente para la replicación. En realizaciones específicas, la partícula de arnavirus descrita en la presente memoria está atenuada. En una realización particular, la partícula de arnavirus trisegmentada se atenúa de manera que el virus sigue siendo, al menos parcialmente, competente para la replicación y puede replicarse *in vivo*, pero solo puede generar bajas cargas virales que dan lugar a niveles subclínicos de infección que no son patógenos. Tales virus atenuados pueden usarse como una composición inmunogénica.

20 En ciertas realizaciones, la partícula de arnavirus trisegmentada tiene el mismo tropismo que la partícula de arnavirus bisegmentada.

También se proporciona en la presente memoria un kit que comprende, en uno o más contenedores, uno o más ADNc descritos en la presente memoria. En una realización específica, un kit comprende, en uno o dos o más contenedores, una partícula de arnavirus trisegmentada como se describe en la presente memoria. El kit puede comprender además uno o más de los siguientes: una célula huésped adecuada para el rescate de la partícula de arnavirus trisegmentada, reactivos adecuados para transfectar el ADNc del plásmido en una célula huésped, un virus auxiliar, plásmidos que codifican proteínas virales y/o uno o más cebadores oligonucleotídicos específicos para un segmento genómico de arnavirus o partícula de arnavirus modificados o ácidos nucleicos que codifican el mismo.

25 También se proporcionan en la presente memoria composiciones inmunogénicas que comprenden la partícula de arnavirus trisegmentada como se describe en las Sección 4.6 y 4.7.

4.2.1 Partícula de arnavirus trisegmentada que comprende un segmento L y dos segmentos S

En un aspecto, en la presente memoria se proporciona una partícula de arnavirus trisegmentada que comprende un segmento L y dos segmentos S. En ciertas realizaciones, la propagación de la partícula de arnavirus trisegmentada que comprende un segmento L y dos segmentos S no da como resultado una partícula viral bisegmentada competente para la replicación. En realizaciones específicas, la propagación de la partícula de arnavirus trisegmentada que comprende un segmento L y dos segmentos S no da como resultado una partícula viral bisegmentada competente para la replicación después de al menos 10 días, al menos 20 días, al menos 30 días, a al menos 40 días, al menos 50 días, al menos 60 días, al menos 70 días, al menos 80 días, al menos 90 días o al menos 100 días de infección persistente en ratones que carecen de receptor de interferón tipo I, receptor de interferón tipo II y gen activador de recombinación (RAG1), y que han sido infectados con 10^4 PFU de la partícula de arnavirus trisegmentada (véase la Sección 4.8.13). En otras realizaciones, la propagación de la partícula de arnavirus trisegmentada que comprende un segmento L y dos segmentos S no da como resultado una partícula viral bisegmentada competente para la replicación después de al menos 10 subcultivos, al menos 20 subcultivos, al menos 30 subcultivos, al menos 40 subcultivos, o al menos 50 subcultivos.

35 La partícula de arnavirus trisegmentada con todos los genes virales en sus respectivas posiciones de tipo salvaje es conocida en la técnica (p. ej., Emonet *et al.*, 2011 J. Virol., 85 (4):1473; Popkin *et al.*, 2011, J. Virol., 85 (15):7928). En particular, el genoma del arnavirus trisegmentado consiste en un segmento L y dos segmentos S, en los que un ORF heterólogo (p. ej., un GFP) se inserta en una posición en cada segmento S. Más específicamente, un segmento S codifica GP y GFP, respectivamente. El otro segmento S codifica GFP y NP, respectivamente. El segmento L codifica la proteína L y la proteína Z. Todos los segmentos están flanqueados por las respectivas UTR en 5' y 3'.

40 En ciertas realizaciones, la recombinación entre segmentos de los dos segmentos S de la partícula de arnavirus trisegmentada, proporcionada en la presente memoria, que une los dos ORF arnavirales en uno en lugar de dos segmentos separados da como resultado un promotor no funcional (es decir, un segmento genómico de la estructura: 5' UTR ----- 5' UTR o 3' UTR ----- 3' UTR), en donde cada UTR que forma un extremo del genoma es una secuencia de repetición invertida del otro extremo del mismo genoma.

55 En ciertas realizaciones, la partícula de arnavirus trisegmentada que comprende un segmento L y dos segmentos S ha sido preparada por ingeniería para portar un ORF de arnavirus en una posición distinta de la posición de tipo

salvaje del ORF. La partícula de arnavirus trisegmentada puede comprender un segmento L y dos segmentos S y ha sido preparada por ingeniería para portar dos ORF de arnavirus, o tres ORF de arnavirus, o cuatro ORF de arnavirus, o cinco ORF de arnavirus, o seis ORF de arnavirus en una posición distinta de la posición de tipo salvaje. En realizaciones específicas, la partícula de arnavirus trisegmentada que comprende un segmento L y dos segmentos S comprende un complemento completo de los cuatro ORF de arnavirus. Así, en algunas realizaciones, la partícula de arnavirus trisegmentada es una partícula de arnavirus trisegmentada infecciosa y competente para la replicación. En realizaciones específicas, los dos segmentos S de la partícula de arnavirus trisegmentada se han preparado por ingeniería para portar uno de sus ORF en una posición distinta de la posición de tipo salvaje. En realizaciones más específicas, los dos segmentos S comprenden un complemento completo de los ORF del segmento S. En ciertas realizaciones específicas, el segmento L se ha preparado por ingeniería para portar un ORF en una posición distinta de la posición de tipo salvaje o el segmento L puede ser el segmento genómico de tipo salvaje.

En ciertas realizaciones, uno de los dos segmentos S puede ser:

(i) un segmento S de arnavirus, en donde el ORF que codifica la proteína Z está bajo el control de una 5' UTR de arnavirus;

(ii) un segmento S de arnavirus, en donde el ORF que codifica la proteína L está bajo el control de una 5' UTR de arnavirus;

(iii) un segmento S de arnavirus, en donde el ORF que codifica la NP está bajo el control de una 5' UTR de arnavirus;

(iv) un segmento S de arnavirus, en donde el ORF que codifica la GP está bajo el control de una 3' UTR de arnavirus;

(v) un segmento S de arnavirus, en donde el ORF que codifica L está bajo el control de una 3' UTR de arnavirus; y

(vi) un segmento S de arnavirus, en donde el ORF que codifica la proteína Z está bajo el control de una 3' UTR de arnavirus.

En ciertos ejemplos, la partícula de arnavirus trisegmentada que comprende un segmento L y dos segmentos S puede comprender un ORF duplicado (es decir, dos ORF de segmento S de tipo salvaje, p. ej., GP o NP). En ejemplos específicos, la partícula de arnavirus trisegmentada que comprende un segmento L y dos segmentos S puede comprender un ORF duplicado (p. ej., (GP, GP)) o dos ORF duplicados (p. ej., (GP, GP) y (NP, NP)).

La Tabla 2A, a continuación, es una ilustración de la organización del genoma de una partícula de arnavirus trisegmentada que comprende un segmento L y dos segmentos S, en donde la recombinación entre segmentos de los dos segmentos S en el genoma de arnavirus trisegmentado no da como resultado una partícula viral bisegmentada competente para la replicación y anula la actividad del promotor arnaviral (es decir, el segmento S recombinado resultante está formado por dos 3' UTR en lugar de una 3' UTR y una 5' UTR).

Tabla 2A

Partícula de arnavirus trisegmentada que comprende un segmento L y dos segmentos S

La posición 1 está bajo el control de una 5' UTR del segmento S de arnavirus; La posición 2 está bajo el control de una 3' UTR del segmento S de arnavirus; La posición 3 está bajo el control de una 5' UTR del segmento S de arnavirus; La Posición 4 está bajo el control de una 3' UTR del segmento S de arnavirus; La posición 5 está bajo el control de una 5' UTR del segmento L de arnavirus; La posición 6 está bajo el control de una 3' UTR del segmento L de arnavirus.

* ORF indica que se ha insertado un ORF heterólogo.

Posición 1	Posición 2	Posición 3	Posición 4	Posición 5	Posición 6
* ORF	GP	* ORF	NP	Z	L
* ORF	NP	* ORF	GP	Z	L
* ORF	NP	* ORF	GP	L	Z
* ORF	NP	* ORF	Z	L	GP
* ORF	NP	Z	GP	* ORF	Z
* ORF	NP	Z	GP	Z	* ORF

ES 2 811 093 T3

Posición 1	Posición 2	Posición 3	Posición 4	Posición 5	Posición 6
* ORF	NP	* ORF	L	Z	GP
* ORF	L	* ORF	NP	Z	GP
* ORF	L	Z	NP	* ORF	GP
* ORF	L	* ORF	GP	Z	NP
* ORF	L	Z	GP	* ORF	NP
* ORF	Z	L	NP	* ORF	GP
* ORF	Z	* ORF	GP	L	NP
* ORF	Z	L	GP	* ORF	NP
L	GP	* ORF	NP	* ORF	Z
L	GP	* ORF	* ORF	Z	NP
L	GP	* ORF	Z	* ORF	NP
L	* ORF	Z	GP	* ORF	NP
L	GP	* ORF	NP	* ORF	Z
L	GP	* ORF	Z	* ORF	NP
L	GP	Z	NP	* ORF	* ORF
L	GP	Z	NP	* ORF	* ORF
L	* ORF	Z	NP	* ORF	GP
L	NP	* ORF	Z	* ORF	GP
L	NP	Z	* ORF	GP	* ORF
L	* ORF	Z	* ORF	GP	NP
L	NP	Z	GP	* ORF	* ORF
L	NP	* ORF	Z	* ORF	GP
L	* ORF	Z	NP	* ORF	GP
L	Z	* ORF	GP	* ORF	NP
L	Z	* ORF	NP	* ORF	GP
Z	GP	* ORF	NP	* ORF	L
Z	GP	* ORF	* ORF	L	NP

Posición 1	Posición 2	Posición 3	Posición 4	Posición 5	Posición 6
Z	GP	* ORF	L	* ORF	NP
Z	* ORF	L	GP	* ORF	NP
Z	GP	* ORF	NP	* ORF	L
Z	GP	* ORF	L	* ORF	NP
Z	GP	L	NP	* ORF	* ORF
Z	GP	L	NP	* ORF	* ORF
Z	* ORF	L	NP	* ORF	GP
Z	NP	* ORF	* ORF	L	GP
Z	NP	* ORF	GP	* ORF	L
Z	NP	* ORF	* ORF	L	GP
Z	NP	* ORF	L	* ORF	GP
Z	NP	L	GP	* ORF	* ORF
Z	* ORF	L	GP	* ORF	NP
Z	NP	* ORF	GP	* ORF	L
Z	NP	* ORF	L	* ORF	GP
Z	* ORF	L	NP	* ORF	GP
Z	L	* ORF	GP	* ORF	NP

5 En ciertas realizaciones, la IGR entre la posición uno y la posición dos puede ser una IGR del segmento S o segmento L de arnavirus; la IGR entre las posiciones dos y tres puede ser una IGR del segmento S o segmento L de arnavirus; y la IGR entre las posiciones cinco y seis puede ser una IGR del segmento L de arnavirus. En una realización específica, la IGR entre la posición uno y la posición dos puede ser una IGR del segmento S de arnavirus; la IGR entre las posiciones dos y tres puede ser una IGR del segmento S de arnavirus; y la IGR entre las posiciones cinco y seis puede ser una IGR del segmento L de arnavirus. En ciertas realizaciones, también son posibles otras combinaciones. Por ejemplo, una partícula de arnavirus trisegmentada que comprende un segmento L y dos segmentos S, en donde la recombinación entre segmentos de los dos segmentos S en el genoma de arnavirus trisegmentado no da como resultado una partícula viral bisegmentada competente para la replicación y anula la actividad de promotor arnaviral (es decir, el segmento S recombinado resultante está formado por dos 5' UTR en lugar de una 3' UTR y una 5' UTR).

15 En ciertas realizaciones, la recombinación entre segmentos de un segmento S y un segmento L en la partícula de arnavirus trisegmentada que comprende un segmento L y dos segmentos S, restaura un segmento funcional con dos genes virales en un solo segmento en lugar de dos segmentos separados. En otras realizaciones, la recombinación entre segmentos de un segmento S y un segmento L en la partícula de arnavirus trisegmentada que comprende un segmento L y dos segmentos S no da como resultado una partícula viral bisegmentada competente para la replicación.

20 La Tabla 2B, a continuación, es una ilustración de la organización del genoma de una partícula de arnavirus trisegmentada que comprende un segmento L y dos segmentos S, en donde la recombinación entre segmentos de un segmento S y un segmento L en el genoma de arnavirus trisegmentado no da como resultado una partícula viral bisegmentada competente para la replicación y anula la actividad del promotor arnaviral, es decir, el segmento S recombinado resultante está formado por dos 3' UTR en lugar de una 3' UTR y una 5' UTR).

Tabla 2B

Partícula de arenavirus trisegmentada que comprende un segmento L y dos segmentos S

5 La posición 1 está bajo el control de una 5' UTR del segmento S de arenavirus; La posición 2 está bajo el control de una 3' UTR del segmento S de arenavirus; La posición 3 está bajo el control de una 5' UTR del segmento S de arenavirus; La posición 4 está bajo el control de una 3' UTR del segmento S de arenavirus; La posición 5 está bajo el control de una 5' UTR del segmento L de arenavirus; La posición 6 está bajo el control de una 3' UTR del segmento L de arenavirus.

* ORF indica que se ha insertado un ORF heterólogo.

Posición 1	Posición 2	Posición 3	Posición 4	Posición 5	Posición 6
L	GP	* ORF	NP	Z	* ORF
L	GP	Z	* ORF	* ORF	NP
L	GP	* ORF	NP	Z	* ORF
L	GP	Z	* ORF	* ORF	NP
L	NP	* ORF	GP	Z	* ORF
L	NP	Z	* ORF	* ORF	GP
L	NP	* ORF	GP	Z	* ORF
L	NP	Z	* ORF	* ORF	GP
Z	GP	* ORF	NP	L	* ORF
Z	GP	L	* ORF	* ORF	NP
Z	GP	* ORF	NP	L	* ORF
Z	NP	L	* ORF	* ORF	GP
Z	NP	* ORF	GP	L	* ORF
Z	NP	L	* ORF	* ORF	GP

10 En ciertas realizaciones, la IGR entre la posición uno y la posición dos puede ser una IGR del segmento S o segmento L de arenavirus; la IGR entre las posiciones dos y tres puede ser una IGR del segmento S o segmento L de arenavirus; y la IGR entre las posiciones cinco y seis puede ser una IGR del segmento L de arenavirus. En una realización específica, la IGR entre la posición uno y la posición dos puede ser una IGR del segmento S de arenavirus; la IGR entre las posiciones dos y tres puede ser una IGR del segmento S de arenavirus; y la IGR entre las posiciones cinco y seis puede ser una IGR del segmento L de arenavirus. En ciertas realizaciones, también son posibles otras combinaciones. Por ejemplo, una partícula de arenavirus trisegmentada que comprende un segmento L y dos segmentos S, en donde la recombinación entre segmentos de los dos segmentos S en el genoma de arenavirus trisegmentado no da como resultado una partícula viral bisegmentada competente para la replicación y anula la actividad del promotor arenaviral (es decir, el segmento S recombinado resultante está formado por dos 5' UTR en lugar de una 3' UTR y una 5' UTR).

20 En ciertas realizaciones, un experto en la técnica podría construir un genoma de arenavirus con una organización como se ilustra en la Tabla 2A o 2B y como se describe en la presente memoria, y luego usar un ensayo como se describe en la Sección 4.8 para determinar si la partícula de arenavirus trisegmentada es genéticamente estable, es decir, no da como resultado una partícula viral bisegmentada competente para la replicación como se discute en la presente memoria.

25

4.2.2 Partícula de arnavirus trisegmentada que comprende dos segmentos L y un segmento S

En un aspecto, en la presente memoria se proporciona una partícula de arnavirus trisegmentada que comprende dos segmentos L y un segmento S. En ciertas realizaciones, la propagación de la partícula de arnavirus trisegmentada que comprende dos segmentos L y un segmento S no da como resultado una partícula viral bisegmentada competente para la replicación. En realizaciones específicas, la propagación de la partícula de arnavirus trisegmentada que comprende dos segmentos L y un segmento S no da como resultado una partícula viral bisegmentada competente para la replicación después de al menos 10 días, al menos 20 días, al menos 30 días, al menos 40 días, o al menos 50 días, al menos 60 días, al menos 70 días, al menos 80 días, al menos 90 días, al menos 100 días de persistencia en ratones que carecen de receptor de interferón tipo I, receptor de interferón tipo II y gen activador de la recombinación (RAG1), y que han sido infectados con 10^4 PFU de la partícula de arnavirus trisegmentada (véase la Sección 4.8.13). En otras realizaciones, la propagación de la partícula de arnavirus trisegmentada que comprende dos segmentos L y un segmento S no da como resultado una partícula viral bisegmentada competente para la replicación después de al menos 10 subcultivos, 20 subcultivos, 30 subcultivos, 40 subcultivos, o 50 subcultivos.

En ciertas realizaciones, la recombinación entre segmentos de los dos segmentos L de la partícula de arnavirus trisegmentada, proporcionada en la presente memoria, que une los dos ORF arnavirales en uno en lugar de dos segmentos separados da como resultado un promotor no funcional (es decir, un segmento genómico de la estructura: 5' UTR ----- 5' UTR o 3' UTR ----- 3' UTR), en donde cada UTR que forma un extremo del genoma es una secuencia de repetición invertida del otro extremo del mismo genoma.

En ciertas realizaciones, la partícula de arnavirus trisegmentada que comprende dos segmentos L y un segmento S ha sido preparada por ingeniería para portar un ORF de arnavirus en una posición distinta de la posición de tipo salvaje del ORF. La partícula de arnavirus trisegmentada puede comprender dos segmentos L y un segmento S y ha sido preparada por ingeniería para portar dos ORF de arnavirus, o tres ORF de arnavirus, o cuatro ORF de arnavirus, o cinco ORF de arnavirus, o seis ORF de arnavirus en una posición distinta de la posición de tipo salvaje. En realizaciones específicas, la partícula de arnavirus trisegmentada que comprende dos segmentos L y un segmento S comprende un complemento completo de los cuatro ORF de arnavirus. Así, en algunas realizaciones, la partícula de arnavirus trisegmentada es una partícula de arnavirus trisegmentada infecciosa y competente para la replicación. En realizaciones específicas, los dos segmentos L de la partícula de arnavirus trisegmentada se han preparado por ingeniería para portar uno de sus ORF en una posición distinta de la posición de tipo salvaje. En realizaciones más específicas, los dos segmentos L comprenden un complemento completo de los ORF del segmento L. En ciertas realizaciones específicas, el segmento S ha sido preparado por ingeniería para portar uno de sus ORF en una posición distinta de la posición de tipo salvaje o el segmento S puede ser el segmento genómico de tipo salvaje.

En ciertas realizaciones, uno de los dos segmentos L puede ser:

- (i) un segmento L, en donde el ORF que codifica la GP está bajo el control de una 5' UTR de arnavirus;
- (ii) un segmento L, en donde el ORF que codifica NP está bajo el control de una 5' UTR de arnavirus;
- (iii) un segmento L, en donde el ORF que codifica la proteína L está bajo el control de una 5' UTR de arnavirus;
- (iv) un segmento L, en donde el ORF que codifica la GP está bajo el control de una 3' UTR de arnavirus;
- (v) un segmento L, en donde el ORF que codifica la NP está bajo el control de una 3' UTR de arnavirus; y
- (vi) un segmento L, en donde el ORF que codifica la proteína Z está bajo el control de una 3' UTR de arnavirus.

En ciertos ejemplos, la partícula de arnavirus trisegmentada que comprende un segmento L y dos segmentos S puede comprender un ORF duplicado (es decir, dos ORF de segmento L de tipo salvaje, p. ej., proteína Z o proteína L). En ejemplos específicos, la partícula de arnavirus trisegmentada que comprende dos segmentos L y un segmento S puede comprender un ORF duplicado (p. ej., (proteína Z, proteína Z)) o dos ORF duplicados (p. ej., (proteína Z, proteína Z) y (proteína L, proteína L)).

La Tabla 3, a continuación, es una ilustración de la organización del genoma de una partícula de arnavirus trisegmentada que comprende dos segmentos L y un segmento S, en donde la recombinación entre segmentos de los dos segmentos L en el genoma de arnavirus trisegmentado no da como resultado una partícula viral bisegmentada competente para la replicación y anula la actividad del promotor arnaviral (es decir, el supuesto segmento L recombinante resultante estaría compuesto por dos 3' UTR o dos 5' UTR en lugar de una 3' UTR y una 5' UTR). Sobre la base de la Tabla 3, se podrían predecir combinaciones similares para generar una partícula de arnavirus compuesta por dos 5' UTR en lugar de una 3' UTR y una 5' UTR.

Tabla 3

Partícula de arnavirus trisegmentada que comprende dos segmentos L y un segmento S

* La posición 1 está bajo el control de una 5' UTR del segmento L de arnavirus; la posición 2 está bajo el control de una 3' UTR del segmento L de arnavirus; la posición 3 está bajo el control de una 5' UTR del segmento L de

ES 2 811 093 T3

arenavirus; la posición 4 está bajo el control de una 3' UTR del segmento L de arenavirus; la posición 5 está bajo el control de una 5' UTR del segmento S de arenavirus; la posición 6 está bajo el control de una 3' UTR del segmento S de arenavirus.

* ORF indica que se ha insertado un ORF heterólogo.

Posición 1	Posición 2	Posición 3	Posición 4	Posición 5	Posición 6
ORF*	Z	ORF*	L	NP	GP
ORF*	Z	ORF*	L	GP	NP
ORF*	Z	GP	L	ORF*	NP
ORF*	Z	ORF*	GP	NP	L
ORF*	Z	GP	ORF*	NP	L
ORF*	Z	NP	ORF*	GP	L
ORF*	ORF*	NP	Z	GP	L
ORF*	Z	GP	NP	ORF*	L
ORF*	Z	NP	GP	ORF*	L
ORF*	L	ORF*	Z	NP	GP
ORF*	L	ORF*	Z	GP	NP
ORF*	L	ORF*	GP	NP	Z
ORF*	L	GP	Z	ORF*	NP
ORF*	L	ORF*	GP	NP	Z
ORF*	L	NP	Z	ORF*	GP
ORF*	L	GP	NP	ORF*	Z
ORF*	L	NP	GP	ORF*	Z
ORF*	GP	ORF*	L	NP	Z
ORF*	GP	NP	L	ORF*	Z
ORF*	GP	ORF*	Z	NP	L
ORF*	GP	NP	Z	ORF*	L
ORF*	NP	ORF*	L	GP	Z
ORF*	NP	GP	L	ORF*	Z
ORF*	NP	GP	Z	ORF*	L
ORF*	NP	ORF*	Z	GP	L

Posición 1	Posición 2	Posición 3	Posición 4	Posición 5	Posición 6
ORF*	L	ORF*	Z	NP	GP
ORF*	L	ORF*	Z	GP	NP
ORF*	L	ORF*	NP	GP	Z
ORF*	L	ORF*	GP	NP	Z
ORF*	L	NP	Z	ORF*	GP
ORF*	Z	ORF*	GP	NP	L
ORF*	Z	GP	L	ORF*	NP
ORF*	Z	NP	GP	ORF*	L
ORF*	Z	GP	NP	ORF*	L
ORF*	GP	ORF*	L	NP	Z
ORF*	GP	ORF*	L	Z	NP
ORF*	GP	ORF*	Z	GP	L
ORF*	GP	NP	L	ORF*	Z
GP	L	ORF*	Z	ORF*	NP
GP	L	ORF*	NP	ORF*	Z
GP	Z	ORF*	L	ORF*	NP
GP	Z	ORF*	L	ORF*	NP
GP	Z	ORF*	NP	ORF*	L
GP	NP	ORF*	Z	ORF*	L
NP	L	ORF*	Z	ORF*	GP
NP	L	ORF*	GP	ORF*	Z
NP	L	ORF*	Z	ORF*	GP

5 En ciertas realizaciones, la IGR entre la posición uno y la posición dos puede ser una IGR del segmento S o segmento L de arnavirus; la IGR entre las posiciones dos y tres puede ser una IGR del segmento S o segmento L de arnavirus; y la IGR entre las posiciones cinco y seis puede ser una IGR del segmento S o segmento L de arnavirus. En una realización específica, la IGR entre la posición uno y la posición dos puede ser una IGR del segmento L de arnavirus; la IGR entre las posiciones dos y tres puede ser una IGR del segmento L de arnavirus; y la IGR entre las posiciones cinco y seis puede ser una IGR del segmento S de arnavirus. En ciertas realizaciones, también son posibles otras combinaciones.

10 En ciertas realizaciones, la recombinación entre segmentos de un segmento L y un segmento S de la partícula de arnavirus trisegmentada que comprende dos segmentos L y un segmento S restaura un segmento funcional con dos genes virales en un solo segmento en lugar de dos segmentos separados. En otras realizaciones, la recombinación

entre segmentos de un segmento L y un segmento S en la partícula de arnavirus trisegmentada que comprende dos segmentos L y un segmento S no da como resultado una partícula viral bisegmentada competente para la replicación.

- 5 La Tabla 3B, a continuación, es una ilustración de la organización del genoma de una partícula de arnavirus trisegmentada que comprende dos segmentos L y un segmento S, en donde la recombinación entre segmentos de un segmento L y un segmento S en el genoma de arnavirus trisegmentado no da como resultado una partícula viral bisegmentada competente para la replicación y anula la actividad del promotor arnaviral (es decir, el segmento S recombinado resultante está formado por dos 3' UTR en lugar de una 3' UTR y una 5' UTR).

Tabla 3B

Partícula de arnavirus trisegmentada que comprende dos segmentos L y un segmento S

- 10 * La posición 1 está bajo el control de una 5' UTR del segmento L de arnavirus; la posición 2 está bajo el control de una 3' UTR del segmento L de arnavirus; la posición 3 está bajo el control de una 5' UTR del segmento L de arnavirus; la posición 4 está bajo el control de una 3' UTR del segmento L de arnavirus; la posición 5 está bajo el control de una 5' UTR del segmento S de arnavirus; la posición 6 está bajo el control de una 3' UTR del segmento S de arnavirus.
- 15 * ORF indica que se ha insertado un ORF heterólogo.

Posición 1	Posición 2	Posición 3	Posición 4	Posición 5	Posición 6
NP	Z	* ORF	GP	L	* ORF
NP	Z	GP	* ORF	* ORF	L
NP	Z	* ORF	GP	L	* ORF
NP	Z	GP	* ORF	* ORF	L
NP	L	* ORF	GP	Z	* ORF
NP	L	GP	* ORF	* ORF	Z
NP	L	* ORF	GP	Z	* ORF
NP	L	GP	* ORF	* ORF	Z
GP	Z	* ORF	NP	L	* ORF
GP	Z	NP	* ORF	* ORF	L
GP	Z	* ORF	NP	L	* ORF
GP	L	NP	* ORF	* ORF	Z
GP	L	* ORF	NP	Z	* ORF
GP	L	NP	* ORF	* ORF	Z

- 20 En ciertas realizaciones, la IGR entre la posición uno y la posición dos puede ser una IGR del segmento S o segmento L de arnavirus; la IGR entre las posiciones dos y tres puede ser una IGR del segmento S o segmento L de arnavirus; y la IGR entre las posiciones cinco y seis puede ser una IGR del segmento S o segmento L de arnavirus. En una realización específica, la IGR entre la posición uno y la posición dos puede ser una IGR del segmento L de arnavirus; la IGR entre las posiciones dos y tres puede ser una IGR del segmento L de arnavirus; y la IGR entre las posiciones cinco y seis puede ser una IGR del segmento S de arnavirus. En ciertas realizaciones, también son posibles otras combinaciones.

En ciertas realizaciones, un experto en la técnica podría construir un genoma de arnavirus con una organización

como se ilustra en la Tabla 3A o 3B y como se describe en la presente memoria, y luego usar un ensayo como se describe en la Sección 4.8 para determinar si la partícula de arnavirus trisegmentada es genéticamente estable, es decir, no da como resultado una partícula viral bisegmentada competente para la replicación como se discute en la presente memoria.

5 4.2.3 Partícula de arnavirus trisegmentada deficiente para la replicación

En ciertos ejemplos, en la presente memoria se proporciona una partícula de arnavirus trisegmentada en la que (i) un ORF está en una posición distinta de la posición de tipo salvaje del ORF; y (ii) un ORF que codifica GP, NP, la proteína Z o la proteína L se ha eliminado o se ha inactivado funcionalmente de modo que el virus resultante no pueda producir más partículas infecciosas del virus de la progenie (es decir, es deficiente para la replicación). En ciertos ejemplos, el tercer segmento de arnavirus puede ser un segmento S. En otros ejemplos, el tercer segmento de arnavirus puede ser un segmento L. En ejemplos más específicos, el tercer segmento de arnavirus se puede preparar por ingeniería para portar un ORF en una posición distinta de la posición de tipo salvaje del ORF o el tercer segmento de arnavirus puede ser el segmento genómico de arnavirus de tipo salvaje. En ejemplos aún más específicos, el tercer segmento de arnavirus carece de un ORF de arnavirus que codifique GP, NP, la proteína Z o la proteína L.

En ciertas realizaciones, un segmento genómico trisegmentado podría ser un híbrido de segmento S o L (es decir, un segmento genómico que puede ser una combinación del segmento S y el segmento L). En otras realizaciones, el segmento híbrido es un segmento S que comprende una IGR del segmento L. En otra realización, el segmento híbrido es un segmento L que comprende una IGR del segmento S. En otras realizaciones, el segmento híbrido es una UTR del segmento S con una IGR del segmento L. En otra realización, el segmento híbrido es una UTR del segmento L con una IGR del segmento S. En realizaciones específicas, el segmento híbrido es una 5' UTR del segmento S con una IGR del segmento L o una 3' UTR del segmento S con una IGR del segmento L. En otras realizaciones específicas, el segmento híbrido es una 5' UTR del segmento L con una IGR del segmento S o una 3' UTR del segmento L con una IGR del segmento S.

Una partícula de arnavirus trisegmentada que comprende un genoma modificado genéticamente en donde uno o más ORF se han eliminado o inactivado funcionalmente puede producirse en células complementarias (es decir, células que expresan el ORF de arnavirus que ha sido eliminado o inactivado funcionalmente). El material genético de la partícula de arnavirus resultante puede transferirse tras la infección de una célula huésped en la célula huésped, en donde el material genético puede expresarse y amplificarse. Además, el genoma de la partícula de arnavirus modificada genéticamente descrita en la presente memoria puede codificar un ORF heterólogo de un organismo distinto de una partícula de arnavirus.

En ciertos ejemplos, al menos uno de los cuatro ORF que codifican GP, NP, la proteína Z y la proteína L se elimina y se reemplaza con un ORF heterólogo de un organismo que no sea un arnavirus. En otro ejemplo, al menos un ORF, al menos dos ORF, al menos tres ORF, o al menos cuatro ORF que codifican GP, NP, la proteína Z y la proteína L pueden eliminarse y reemplazarse con un ORF heterólogo de un organismo que no sea un arnavirus. En ejemplos específicos, solo uno de los cuatro ORF que codifican GP, NP, la proteína Z y la proteína L se elimina y reemplaza con un ORF heterólogo de un organismo que no sea una partícula de arnavirus. En ejemplos más específicos, se elimina el ORF que codifica GP del segmento genómico de arnavirus. En otro ejemplo específico, se elimina el ORF que codifica la NP del segmento genómico de arnavirus. En ejemplos más específicos, se elimina el ORF que codifica la proteína Z del segmento genómico de arnavirus. En otro ejemplo específico más, se elimina el ORF que codifica la proteína L.

En ciertos ejemplos, en la presente memoria se describe una partícula de arnavirus trisegmentada que comprende un segmento L y dos segmentos S en los que (i) un ORF está en una posición distinta de la posición de tipo salvaje del ORF; y (ii) se ha eliminado o inactivado funcionalmente un ORF que codifica GP o NP, de modo que el virus resultante es deficiente para la replicación y no es infeccioso. En un ejemplo específico, se elimina un ORF y se reemplaza con un ORF heterólogo de un organismo que no sea un arnavirus. En otro ejemplo específico, se eliminan dos ORF y se reemplazan con un ORF heterólogo de un organismo que no sea un arnavirus. En otros ejemplos específicos, se eliminan tres ORF y se reemplazan con un ORF heterólogo de un organismo que no sea un arnavirus. En ejemplos específicos, el ORF que codifica la GP se elimina y se reemplaza con un ORF heterólogo de un organismo que no sea un arnavirus. En otros ejemplos específicos, el ORF que codifica NP se elimina y se reemplaza con un ORF heterólogo de un organismo que no sea un arnavirus. En ejemplos aún más específicos, el ORF que codifica NP y el ORF que codifica GP se eliminan y se reemplazan con uno o dos ORF heterólogos de un organismo distinto de una partícula de arnavirus. Así, en ciertas realizaciones, la partícula de arnavirus trisegmentada comprende (i) un segmento L y dos segmentos S; (ii) un ORF en una posición distinta de la posición de tipo salvaje del ORF; (iii) uno o más ORF heterólogos de un organismo que no sea un arnavirus.

En ciertos ejemplos, en la presente memoria se proporciona una partícula de arnavirus trisegmentada que comprende dos segmentos L y un segmento S en los que (i) un ORF está en una posición distinta de la posición de tipo salvaje del ORF; y (ii) un ORF que codifica la proteína Z, y/o la proteína L ha sido eliminado o inactivado funcionalmente, de modo que el virus resultante es deficiente para la replicación y no es infeccioso. En un ejemplo específico, se elimina un ORF y se reemplaza con un ORF heterólogo de un organismo que no sea un arnavirus. En otro ejemplo específico,

se eliminan dos ORF y se reemplazan con un ORF heterólogo de otro organismo que no sea un arnavirus. En ejemplos específicos, el ORF que codifica la proteína Z se elimina y se reemplaza con un ORF heterólogo de un organismo que no sea un arnavirus. En otros ejemplos específicos, el ORF que codifica la proteína L se elimina y se reemplaza con un ORF heterólogo de un organismo que no sea un arnavirus. En ejemplos aún más específicos, el ORF que codifica la proteína Z y el ORF que codifica la proteína L se eliminan y se reemplazan con un ORF heterólogo de un organismo que no sea una partícula de arnavirus. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la partícula de arnavirus trisegmentada comprende (i) dos segmentos L y un segmento S; (ii) un ORF en una posición distinta de la posición de tipo salvaje del ORF; (iii) un ORF heterólogo de un organismo que no sea un arnavirus.

Por lo tanto, en ciertos ejemplos, la partícula de arnavirus trisegmentada descrita en la presente memoria comprende una partícula de arnavirus trisegmentada (es decir, un segmento L y dos segmentos S o dos segmentos L y un segmento S) que i) está preparada por ingeniería para portar un ORF en una posición no natural; ii) se elimina un ORF que codifica GP, NP, la proteína Z o la proteína L; iii) el ORF que se elimina se reemplaza con uno o más ORF heterólogos de un organismo que no sea un arnavirus.

En ciertos ejemplos, el ORF heterólogo tiene una longitud de 8 a 100 nucleótidos, una longitud de 15 a 100 nucleótidos, una longitud de 25 a 100 nucleótidos, una longitud de 50 a 200 nucleótidos, una longitud de 50 a 400 nucleótidos, una longitud de 200 a 500 nucleótidos, o una longitud de 400 a 600 nucleótidos, una longitud de 500 a 800 nucleótidos. En otros ejemplos, el ORF heterólogo tiene una longitud de 750 a 900 nucleótidos, una longitud de 800 a 1000 nucleótidos, 850 a 1.000 nucleótidos, una longitud de 900 a 1.200 nucleótidos, una longitud de 1.000 a 1.200 nucleótidos, una longitud de 1.000 a 1.500 nucleótidos o una longitud de 10 a 1.500 nucleótidos, una longitud de 1.500 a 2.000 nucleótidos, una longitud de 1.700 a 2.000 nucleótidos, una longitud de 2.000 a 2.300 nucleótidos, una longitud de 2.200 a 2.500 nucleótidos, una longitud de 2.500 a 3.000 nucleótidos, una longitud de 3.000 a 3.200 nucleótidos, una longitud de 3.000 a 3.500 nucleótidos, una longitud de 3.200 a 3.600 nucleótidos, una longitud de 3.300 a 3.800 nucleótidos, una longitud de 4.000 nucleótidos a 4.400 nucleótidos, una longitud de 4.200 a 4.700 nucleótidos, una longitud de 4.800 a 5.000 nucleótidos, una longitud de 5.000 a 5.200 nucleótidos, una longitud de 5.200 a 5.500 nucleótidos, una longitud de 5.500 a 5.800 nucleótidos, una longitud de 5.800 a 6.000 nucleótidos, una longitud de 6.000 a 6.400 nucleótidos, una longitud de 6.200 a 6.800 nucleótidos, una longitud de 6.600 a 7.000 nucleótidos, una longitud de 7.000 a 7.200 nucleótidos, una longitud de 7.200 a 7.500 nucleótidos, o una longitud de 7.500 nucleótidos. En algunos ejemplos, el ORF heterólogo codifica un péptido o polipéptido que tiene una longitud de 5 a 10 aminoácidos, una longitud de 10 a 25 aminoácidos, una longitud de 25 a 50 aminoácidos, una longitud de 50 a 100 aminoácidos, una longitud de 100 a 150 aminoácidos, una longitud de 150 a 200 aminoácidos, una longitud de 200 a 250 aminoácidos, una longitud de 250 a 300 aminoácidos, una longitud de 300 a 400 aminoácidos, una longitud de 400 a 500 aminoácidos, una longitud de 500 a 750, una longitud de 750 a 1.000 aminoácidos, una longitud de 1.000 a 1.250 aminoácidos, una longitud de 1.250 a 1.500 aminoácidos, una longitud de 1.500 a 1.750 aminoácidos, una longitud de 1.750 a 2.000 aminoácidos, una longitud de 2.000 a 2.500 aminoácidos, o una longitud de más de 2.500 o más aminoácidos. En algunos ejemplos, el ORF heterólogo codifica un polipéptido que no excede una longitud de 2.500 aminoácidos. En ejemplos específicos, el ORF heterólogo no contiene un codón de parada. En ciertos ejemplos, el ORF heterólogo está optimizado para codones. En ciertos ejemplos, la composición de nucleótidos, la composición de pares de nucleótidos o ambas pueden optimizarse. Las técnicas para tales optimizaciones son conocidas en la técnica y pueden aplicarse para optimizar un ORF heterólogo.

Cualquier ORF heterólogo de un organismo que no sea un arnavirus puede incluirse en la partícula de arnavirus trisegmentada. En un ejemplo, el ORF heterólogo codifica una proteína informadora. En la Sección 4.3 se describe una descripción más detallada de las proteínas informadoras. En otro ejemplo, el ORF heterólogo codifica un antígeno para un patógeno infeccioso o un antígeno asociado con cualquier enfermedad y donde el antígeno es capaz de incitar una respuesta inmune. En ejemplos específicos, el antígeno se deriva de un organismo infeccioso, un tumor (es decir, cáncer) o un alérgeno. En la Sección 4.3 se describe una descripción más detallada sobre los ORF heterólogos.

En ciertos ejemplos, el crecimiento y la infectividad de la partícula de arnavirus no se ven afectados por el ORF heterólogo de un organismo que no sea un arnavirus.

Las técnicas conocidas por un experto en la técnica pueden usarse para producir una partícula de arnavirus que comprende un segmento genómico de arnavirus preparado por ingeniería para portar un ORF de arnavirus en una posición distinta de la posición de tipo salvaje. Por ejemplo, pueden usarse técnicas de genética inversa para generar dicha partícula de arnavirus. En otros ejemplos, la partícula de arnavirus deficiente para la replicación (es decir, el segmento genómico de arnavirus preparado por ingeniería para portar un ORF de arnavirus en una posición distinta de la posición de tipo salvaje, en la que se ha delecionado un ORF que codifica GP, NP, la proteína Z, la proteína L) puede producirse en una célula complementaria.

En ciertos ejemplos, la partícula de arnavirus trisegmentada que se usa de acuerdo con la presente solicitud puede ser virus del Viejo Mundo, por ejemplo, LCMV.

En ciertos ejemplos, la presente solicitud se refiere a la partícula de arnavirus como se describe en la presente memoria adecuada para su uso como vacuna y a métodos para usar dicha partícula de arnavirus en una vacunación y tratamiento o prevención de, por ejemplo, infecciones y cánceres. En la Sección 4.6 se proporciona una descripción más detallada de los métodos de uso de la partícula de arnavirus descrita en la presente memoria.

En ciertos ejemplos, la presente solicitud se refiere a la partícula de arnavirus como se describe en la presente memoria adecuada para su uso como una composición farmacéutica y a métodos para usar dicha partícula de arnavirus en una vacunación y tratamiento o prevención de, por ejemplo, infecciones o cánceres. En la Sección 4.6 se proporciona una descripción más detallada de los métodos de uso de la partícula de arnavirus descrita en la presente memoria.

4.3 Partícula de arnavirus o partícula de arnavirus trisegmentada que expresa un ORF heterólogo

En ciertas realizaciones, el segmento genómico de arnavirus y la partícula de arnavirus o partícula de arnavirus trisegmentada respectiva pueden comprender un ORF heterólogo. En otras realizaciones, el segmento genómico de arnavirus y la partícula de arnavirus o partícula de arnavirus trisegmentada respectiva pueden comprender un gen de interés. En realizaciones más específicas, el ORF heterólogo o el gen de interés codifica un antígeno. En realizaciones más específicas, el ORF heterólogo o el gen o interés codifica una proteína informadora o una proteína fluorescente.

El segmento genómico de arnavirus, la partícula de arnavirus o la partícula de arnavirus trisegmentada pueden comprender uno o más ORF heterólogos o uno o más genes de interés. El segmento genómico de arnavirus, la partícula de arnavirus o la partícula de arnavirus trisegmentada pueden comprender al menos un ORF heterólogo, al menos dos ORF heterólogos, al menos tres ORF heterólogos, o más ORF heterólogos. La partícula de arnavirus o la partícula de arnavirus trisegmentada puede comprender al menos un gen de interés, al menos dos genes de interés, al menos tres genes de interés o más genes de interés.

El segmento genómico de arnavirus, la partícula de arnavirus o la partícula de arnavirus trisegmentada de la presente solicitud pueden expresar una amplia variedad de antígenos. En una realización, el ORF heterólogo codifica un antígeno de un patógeno infeccioso o un antígeno asociado con cualquier enfermedad que sea capaz de incitar una respuesta inmune. En ciertas realizaciones, el ORF heterólogo puede codificar un antígeno derivado de un virus, una bacteria, un hongo, un parásito o puede expresarse en un tumor o enfermedad asociada a un tumor (es decir, cáncer), una enfermedad autoinmune, una enfermedad degenerativa, una enfermedad hereditaria, dependencia de sustancias, obesidad o una enfermedad alérgica.

En algunas realizaciones, el ORF heterólogo codifica un antígeno viral. Los ejemplos no limitantes de antígenos virales incluyen antígenos de adenoviridae (p. ej., mastadenovirus y aviadenovirus), herpesviridae (p. ej., virus del herpes simple 1, virus del herpes simple 2, virus del herpes simple 5, virus del herpes simple 6, virus de Epstein-Barr, HHV6-HHV8 y citomegalovirus), leviviridae (p. ej., levivirus, enterobacterias fase MS2, alolevirus), poxyviridae (p. ej., cordopoxyirinae, parapoxvirus, avipoxvirus, capripoxvirus, leporiipoxvirus, suipoxvirus, molluscipoxvirus y entomopoxyirinae), papovaviridae (p. ej., polyomavirus y papilomavirus), paramyxoviridae (p. ej., paramyxovirus, virus de parainfluenza 1, mobillivirus (p. ej., virus del sarampión), rubulavirus (p. ej., virus de las paperas), pneumonovirinae (p. ej., neumovirus, virus sincitial respiratorio humano), virus sincitial respiratorio humano y metapneumovirus (p. ej., neumovirus aviar y metapneumovirus humano), picornaviridae (p. ej., enterovirus, rinovirus, hepatovirus (p. ej., virus de la hepatitis A humana), cardiovirus y aphovirus), reoviridae (p. ej., orthoreovirus, orbivirus, rotavirus, cypovirus, fijivirus, phytoreovirus y oryzavirus), retroviridae (p. ej., retrovirus de mamífero tipo B, retrovirus de mamífero tipo C, retrovirus aviar tipo C, grupo de retrovirus tipo D, retrovirus BLV-HTLV, lentivirus (p. ej. virus de inmunodeficiencia humana (VIH) 1 y VIH-2 (p. ej., VIH gp160), spumavirus), flaviviridae (p. ej., virus de la hepatitis C, virus del dengue, virus del Nilo Occidental), hepadnaviridae (p. ej., virus de la hepatitis B), togaviridae (p. ej., alfavirus (p. ej., virus sindbis) y rubivirus (p. ej., virus de la rubéola)), rbdoviridae (p. ej., vesiculovirus, lyssavirus, ephemerovirus, cytorhabdovirus y necleorhabdovirus), arnaviridae (p. ej., arnavirus, virus de la coriomeningitis linfocítica, virus lppy y virus lassa) y coronaviridae (p. ej., coronavirus y torovirus). En una realización específica, el antígeno viral es VIH gp120, gp41, Nef de VIH, glucoproteína F de RSV, glucoproteína G de RSV, tax de HTLV, glucoproteína del virus del herpes simple (p. ej., gB, gC, gD y gE) o antígeno de superficie de la hepatitis B, la proteína E del virus de la hepatitis C o la proteína de espina de coronavirus. En una realización, el antígeno viral no es un antígeno de VIH.

En otras realizaciones, el ORF heterólogo codifica un antígeno bacteriano (p. ej., proteína de la cubierta bacteriana). En otras realizaciones, el ORF heterólogo codifica un antígeno parasitario (p. ej., un antígeno protozoario). En otras realizaciones más, una secuencia de nucleótidos heteróloga codifica un antígeno fúngico.

Los ejemplos no limitantes de antígenos bacterianos incluyen antígenos de bacterias de la familia Aquaspirillum, familia Azospirillum, familia Azotobacteraceae, familia Bacteroidaceae, especies de Bartonella, familia Bdellovibrio, especies de *Campylobacter*, especies de *Chlamidia* (p. ej., *Chlamydia pneumoniae*), *Clostridium*, familia Enterobacteriaceae (p. ej., especies de *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Enterobacter aerogenes*, especies de *Envinia*, *Escherichia coli*, especies de *Hafnia*, especies de *Klebsiella*, especies de *Morganella*, *Proteus vulgaris*, *Providencia*, especies de *Salmonella*, *Serratia marcescens*, y *Shigella flexneri*), familia Gardinella, *Haemophilus influenzae*, familia Halobacteriaceae, familia Helicobacter, familia Legionallaceae, especies de *Listeria*, familia Methylococcaceae, micobacterias (p. ej., *Mycobacterium tuberculosis*), familia Neisseriaceae, familia Oceanospirillum, familia Pasteurellaceae, especies de *Pneumococcus*, especies de *Pseudomonas*, familia Rhizobiaceae, familia Spirillum, familia Spirosomaceae, *Staphylococcus* (p. ej., *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus pyrogenes* resistente a la metilicina), *Streptococcus* (p. ej., *Streptococcus enteritidis*, *Streptococcus fasciae* y *Streptococcus pneumoniae*), familia *Vampirovibr* *Helicobacter*, familia *Yersinia*, *Bacillus antracis* y familia *Vampirovibrio*.

Los ejemplos no limitantes de antígenos de parásitos incluyen antígenos de un parásito tal como una ameba, un parásito de la malaria, *Plasmodium*, *Trypanosoma cruzi*. Los ejemplos no limitantes de antígenos fúngicos incluyen antígenos de hongos de la especie *Absidia* (p. ej., *Absidia corymbifera* y *Absidia ramosa*), especies de *Aspergillus*, (p. ej., *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, y *Aspergillus terreus*), *Basidiobolus ranarum*, *Blastomyces dermatitidis*, especies de *Candida* (p. ej., *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida kern*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida quillermondii*, *Candida rugosa*, *Candida stellatoidea*, y *Candida tropicalis*), *Coccidioides immitis*, especies de *Conidiobolus*, *Cryptococcus neoforms*, especies de *Cunninghamella*, dermatofitos, *Histoplasma capsulatum*, *Microsporium gypseum*, *Mucor pusillus*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Pseudallescheria boydii*, *Rhinosporidium seeberi*, *Pneumocystis carinii*, especies de *Rhizopus* (p. ej., *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus oryzae* y *Rhizopus microsporus*), especies de *Saccharomyces*, *Sporothrix schenckii*, *zigomycetos*, y clases tales como Zygomycetes, Ascomycetes, Basidiomycetes, Deuteromycetes y Oomycetes.

En algunas realizaciones, un ORF heterólogo codifica un antígeno tumoral o un antígeno asociado a tumor. En algunas realizaciones, el antígeno tumoral o el antígeno asociado a tumor incluye antígenos de enfermedades asociadas a tumor que incluyen leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, carcinoma adrenocortical, carcinoma adrenocortical infantil, cánceres relacionados con el SIDA, sarcoma de Kaposi, cáncer anal, cáncer de apéndice, astrocitomas, tumor teratoideo/rabdoideo atípico, carcinoma de células basales, cáncer de conducto biliar, extrahepático (véase colangiocarcinoma), cáncer de vejiga, osteosarcoma óseo/histiocitoma fibroso maligno, glioma del tronco encefálico, cáncer cerebral, tumor cerebral, astrocitoma cerebeloso, astrocitoma cerebral/tumor de cerebro glioma maligno, ependimoma, meduloblastoma, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, glioma de vía visual e hipotalámico, cáncer de mama, adenomas bronquiales/carcinoides, linfoma de Burkitt, tumor carcinoide, tumor gastrointestinal carcinoide, carcinoma de primario desconocido, linfoma del sistema nervioso central, primario, astrocitoma cerebeloso, astrocitoma cerebral/glioma maligno, cáncer de cuello uterino, cánceres infantiles, bronquitis crónica, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer de colon, linfoma cutáneo de células T, tumor desmoplásico de células pequeñas y redondas, enfisema, cáncer endometrial, ependimoma, cáncer de esófago, sarcoma de Ewing en el familia de tumores de Ewing, tumor de células germinales extracraneal, tumor de células germinales extragonadal, cáncer extrahepático de las vías biliares, melanoma intraocular, retinoblastoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico (estómago), tumor carcinoide gastrointestinal, tumor del estroma gastrointestinal, tumor de células germinales: extracraneal, extragonadal, o tumor trofoblástico gestacional ovárico, glioma del tronco encefálico, glioma, astrocitoma cerebral infantil, vía visual infantil e hipotálamo, carcinoide gástrico, leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer cardíaco, cáncer hepatocelular (hígado), linfoma de Hodgkin, cáncer hipofaríngeo, glioma de la vía hipotalámica y visual, melanoma intraocular, carcinoma de células de los islotes (páncreas endocrino), sarcoma de kaposi, cáncer de riñón (cáncer de células renales), cáncer de laringe, linfoma linfoblástico agudo, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielógena aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, cáncer de labio y cavidad oral, liposarcoma, cáncer de hígado (primario), cáncer de pulmón, células no pequeñas, células pequeñas, linfoma relacionado con el SIDA, linfoma de Burkitt, linfoma cutáneo de células T, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, linfoma, sistema nervioso central primario, macroglobulinemia de Waldenström, cáncer mama masculina, histiocitoma fibroso maligno de hueso/osteosarcoma, meduloblastoma, melanoma, intraocular (ojo), cáncer de células de Merkel, mesotelioma maligno del adulto, mesotelioma, cáncer de cuello escamoso metastásico con primario oculto, cáncer de boca, síndrome de neoplasia endocrina múltiple, mieloma múltiple/neoplasma de células plasmáticas, micosis fungoide, síndromes mielodisplásicos, enfermedades mielodisplásicas/mieloproliferativas, leucemia mielógena, leucemia mieloide crónica, leucemia mieloide aguda del adulto, aguda infantil, mieloma múltiple (cáncer de la médula ósea), trastornos mieloproliferativos, crónica, cáncer de la cavidad nasal y de seno paranasal, carcinoma nasofaríngeo, neuroblastoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas, oligodendroglioma, cáncer oral, cáncer orofaríngeo, osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno de hueso, cáncer de ovario, cáncer epitelial de ovario (tumor epitelial-estromal de superficie), tumor de células germinales de ovario, tumor ovárico de bajo potencial maligno, cáncer de páncreas, células de los islotes, cáncer de seno paranasal y cavidad nasal, cáncer de paratiroides, cáncer de pene, cáncer de faringe, feocromocitoma, astrocitoma pineal, germinoma pineal, pineoblastoma y tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, adenoma pituitario, neoplasia de células plasmáticas/mieloma múltiple, blastoma pleuropulmonar, linfoma primario del sistema nervioso central, cáncer de próstata, cáncer de recto, carcinoma de células renales (cáncer de riñón), pelvis renal y uréter, cáncer de células de transición, retinoblastoma, rabdomiosarcoma, infancia, cáncer de glándulas salivales, sarcoma, familia de tumores de Ewing, sarcoma de Kaposi, sarcoma de tejidos blandos, sarcoma uterino, síndrome de Sézary, cáncer de piel (no melanoma), cáncer de piel (melanoma), carcinoma de piel de células merkel, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejidos blandos, carcinoma de células escamosas - véase cáncer de piel (no melanoma), cáncer de cuello escamoso con cáncer primario oculto, metastásico, cáncer de estómago, tumor neuroectodérmico primitivo supratentorial, linfoma de células T, cutáneo - véase Micosis fungoide y síndrome de Sézary, cáncer testicular, cáncer de garganta, timoma y carcinoma tímico, cáncer de tiroides, cáncer de células transicionales infantiles de la pelvis renal y el uréter, tumor trofoblástico gestacional, sitio primario desconocido, carcinoma de, sitio primario desconocido del adulto, cáncer de la infancia, uréter y pelvis renal, cáncer de células de transición, cáncer de recto, cáncer uterino, sarcoma uterino endometrial, tumor bronquial, tumor embrionario del sistema nervioso central; cordoma infantil, cáncer colorrectal, craneofaringioma, ependimoblastoma, histiocitosis de células de Langerhans, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda (adulto/infancia), cáncer de pulmón de células pequeñas, meduloepitelioma, cáncer de cavidad oral, papilomatosis, tumores parenquimatosos pineales de diferenciación intermedia, tumor pituitario,

carcinoma del tracto respiratorio que implica el gen NUT en el cromosoma 15, tumor de la médula espinal, timoma, cáncer de tiroides, cáncer vaginal; cáncer vulvar y tumor de Wilms.

Los ejemplos no limitantes de antígeno de tumor o asociados a tumor incluyen Adipofilina, AIM-2, ALDH1A1, BCLX (L), BING-4, CALCA, CD45, CPSF, ciclina D1, DKK1, ENAH (hMena), EpCAM, EphA3, EZH2, FGF5, glipicano-3, G250/MN/CAIX, HER-2/neu, IDO1, IGF2B3, IL13Ralpha2, carboxil esterasa intestinal, alfa-fetoproteína, Calicreína 4, KIF20A, Lengsina, M-CSF, MCSP, mdm-2, Meloe, MMP-2, MMP-7, MUC1, MUC5AC, p53, PAX5, PBF, PRAME, PSMA, RAGE-1, RGS5, RhoC, RNF43, RU2AS, secernina 1, SOX10, STEAP1, survivina, Telomerasa, VEGF o WT1, EGF-R, CEA, CD52, proteína gp 100, MELANA/MART1, NY-ESO-1, p53 MAGE1, MAGE3 y CDK4, alfa-actinina-4, ARTC1, proteína de fusión BCR-ABL (b3a2), B-RAF, CASP-5, CASP-8, beta-catenina, Cdc27, CDK4, CDKN2A, CLPP, COA-1, proteína de fusión dek-can, EFTUD2, Factor de elongación 2, proteína de fusión ETV6-AML1, FLT3-ITD, FN1, GPNMB, proteína de fusión LDLR-fucosiltransferasaS, NFYC, OGT, OS-9, proteína de fusión pm1-RARalfa, PRDX5, PTPRK, K-ras, N-ras, RBAF600, SIRT2, SNRPD1, proteína de fusión SYT-SSX1 o SSX2, TGF-betaRII, Triosefosfato isomerasa, Lengsina, M-CSF, MCSP o mdm-2.

En algunas realizaciones, el ORF heterólogo codifica un antígeno de un patógeno respiratorio. En una realización específica, el patógeno respiratorio es un virus tal como RSV, coronavirus, metapneumovirus humano, virus de parainfluenza, virus hendra, virus nipah, adenovirus, rinovirus o PRRSV. Los ejemplos no limitantes de antígenos virales respiratorios incluyen las proteínas F, G y M2 del virus sincitial respiratorio, las proteínas de la espina (S) del coronavirus (SARS, HuCoV), las proteínas de fusión del metapneumovirus humano, la fusión del virus de parainfluenza y las proteínas de hemaglutinina (F,HN), el virus de Hendra (HeV) y glucoproteínas de unión del virus de Nipah (NiV) (G y F), proteínas de la cápside de adenovirus, proteínas de rinovirus y proteínas de tipo salvaje PR5V o GP5 y M modificadas.

En una realización específica, el patógeno respiratorio es una bacteria tal como *Bacillus anthracis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Bordetella pertussis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Yersinia pestis*, *Staphylococcus aureus*, *Francisella tularensis*, *Legionella pneumophila*, *Chlamydia pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria meningitidis* y *Haemophilus influenzae*. Los ejemplos no limitantes de antígenos bacterianos respiratorios incluyen antígeno protector PA de *Bacillus anthracis*, antígeno micobacteriano 85A y proteína de choque térmico (Hsp65) de *Mycobacterium tuberculosis*, toxoide pertussis de *Bordetella pertussis* (PT) y hemaglutinina filamentosa (FHA), sortasa A y adhesina de superficie A de *Streptococcus pneumoniae* (PsaA), subunidades F1 y V de *Yersinia pestis*, y proteínas de *Staphylococcus aureus*, *Francisella tularensis*, *Legionella pneumophila*, *Chlamydia pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria meningitidis* y *Haemophilus influenzae*.

En algunas realizaciones, el ORF heterólogo codifica un epítipo de células T. En otras realizaciones, el ORF heterólogo codifica una citoquina o factor de crecimiento.

En otras realizaciones, el ORF heterólogo codifica un antígeno expresado en una enfermedad autoinmune. En realizaciones más específicas, la enfermedad autoinmune puede ser diabetes tipo I, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, lupus eritematoso y psoriasis. Los ejemplos no limitantes de antígenos de enfermedades autoinmunes incluyen Ro60, ADNds o RNP.

En otras realizaciones, el ORF codifica un antígeno expresado en una enfermedad alérgica. En realizaciones más específicas, la enfermedad alérgica puede incluir, pero no está limitada a, rinoconjuntivitis estacional y perenne, asma y eccema. Los ejemplos no limitantes de antígenos de alergia incluyen Bet v 1 y Fel d 1.

En otras realizaciones, el segmento genómico de arenavirus, la partícula de arenavirus o la partícula de arenavirus trisegmentada comprenden además una proteína informadora. La proteína informadora es capaz de expresarse al mismo tiempo que el antígeno descrito en la presente memoria. Idealmente, la expresión es visible en luz normal u otras longitudes de onda de luz. En ciertas realizaciones, la intensidad del efecto creado por la proteína informadora se puede usar para medir y monitorizar directamente la partícula de arenavirus o la partícula de arenavirus trisegmentada.

Los genes informadores serían fácilmente reconocidos por un experto en la técnica. En ciertas realizaciones, la partícula de arenavirus es una proteína fluorescente. En otras realizaciones, el gen informador es GFP. GFP emite luz verde brillante cuando se expone a rayos UV o azules.

Los ejemplos no limitantes de proteínas informadoras incluyen diversas enzimas, tales como, pero no limitado a, β -galactosidasa, cloranfenicol acetiltransferasa, neomicina fosfotransferasa, luciferasa o RFP.

En ciertas realizaciones, el segmento genómico de arenavirus, la partícula de arenavirus o la partícula de arenavirus trisegmentada que expresa un ORF heterólogo tiene propiedades deseables para su uso como un vector para la vacunación (véase. p. ej., la Sección 4.6). En otra realización, el segmento genómico de arenavirus, la partícula de arenavirus o la partícula de arenavirus trisegmentada que expresa un ORF heterólogo es capaz de inducir una respuesta inmune en un huésped (p. ej., ratón conejo, cabra, burro, ser humano). En otras realizaciones, el segmento genómico de arenavirus, la partícula de arenavirus o la partícula de arenavirus trisegmentada que expresa un ORF heterólogo descrito en la presente memoria induce una respuesta inmune innata. En otras realizaciones, el segmento genómico de arenavirus, la partícula de arenavirus o la partícula de arenavirus trisegmentada que expresa un ORF

heterólogo induce una respuesta inmune adaptativa. En realizaciones más específicas, el segmento genómico de arenavirus, la partícula de arenavirus o la partícula de arenavirus trisegmentada que expresa un ORF heterólogo, tanto una respuesta inmune innata como adaptativa.

5 En otra realización, el segmento genómico de arenavirus, la partícula de arenavirus o la partícula de arenavirus trisegmentada que expresa un ORF heterólogo induce una respuesta de células T. En realizaciones aún más específicas, el segmento genómico de arenavirus, la partícula de arenavirus o la partícula de arenavirus trisegmentada que expresa un ORF heterólogo induce una respuesta de células T CD8+. En otras realizaciones, la partícula de arenavirus que porta un gen extraño de interés induce una potente respuesta de células T CD8+ de alta frecuencia y funcionalidad. En otras realizaciones, el segmento genómico de arenavirus, la partícula de arenavirus o la partícula de arenavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado de un organismo infeccioso, un cáncer o un alérgeno induce células T CD8+ específicas para uno o múltiples epítomos del gen extraño de interés correspondiente.

10 En ciertas realizaciones, el segmento genómico de arenavirus, la partícula de arenavirus o la partícula de arenavirus trisegmentada que expresa un ORF heterólogo puede inducir la diferenciación de T auxiliar 1, formación de de células T CD4+ de memoria y/o incitar respuestas de anticuerpos duraderas. Estos anticuerpos pueden ser neutralizantes, opsonizantes, tóxicos para las células tumorales o tener otras características biológicas favorables. En otras realizaciones, el segmento genómico de arenavirus, la partícula de arenavirus o la partícula de arenavirus trisegmentada que expresa un ORF heterólogo tiene un fuerte tropismo por las células dendríticas y las activa tras la infección. Esto potencia la presentación del antígeno por las células presentadoras de antígeno.

15 En ciertas realizaciones, el segmento genómico de arenavirus, la partícula de arenavirus o la partícula de arenavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado de un organismo infeccioso, un cáncer o un alérgeno induce titulaciones de anticuerpos neutralizantes bajas o indetectables frente a LCMV y altas respuestas de anticuerpos neutralizantes protectores frente al transgén extraño respectivo. En algunas realizaciones, el esqueleto de arenavirus que forma la partícula o partícula de arenavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado de un organismo infeccioso, un cáncer o un alérgeno tiene una baja capacidad para inducir inmunidad frente a los componentes del esqueleto arenaviral.

20 4.4 Generación de una partícula de arenavirus y una partícula de arenavirus trisegmentada

En general, las partículas de arenavirus se pueden producir de forma recombinante mediante técnicas genéticas inversas estándar como se describe para LCMV (véase, Flatz *et al.*, 2006, Proc Natl Acad Sci USA 103: 4663-4668; Sanchez *et al.*, 2006, Virology 350:370; Ortiz-Riano *et al.*, 2013, J Gen Virol. 94: 1175-88). Para generar las partículas de arenavirus proporcionadas en la presente memoria, estas técnicas se pueden aplicar como se describe a continuación. El genoma de los virus se puede modificar como se describe en la Sección 4.1 y la Sección 4.2, respectivamente.

25 4.4.1 Marco de lectura abierto en una posición no natural

La generación de una partícula de arenavirus que comprende un segmento genómico que ha sido preparado por ingeniería para portar un ORF viral en una posición distinta de la posición de tipo salvaje del ORF puede producirse de forma recombinante mediante cualquier técnica genética inversa conocida por un experto en la técnica.

30 (i) Partículas de arenavirus infecciosas y competentes para la replicación

En ciertas realizaciones, el método para generar la partícula de arenavirus comprende (i) transfectar en una célula huésped el ADNc del primer segmento genómico de arenavirus; (ii) transfectar en una célula huésped el ADNc del segundo segmento genómico de arenavirus; (iii) transfectar en una célula huésped plásmidos que expresan los factores que actúan en trans mínimos del arenavirus NP y L; (iv) mantener la célula huésped en condiciones adecuadas para la formación de virus; y (v) recoger la partícula de arenavirus. En ciertas realizaciones más específicas, el ADNc está comprendido en un plásmido.

45 Una vez generadas a partir del ADNc, las partículas de arenavirus (es decir, infecciosas y competente para la replicación) se pueden propagar. En ciertas realizaciones, la partícula de arenavirus puede propagarse en cualquier célula huésped que permita que el virus crezca hasta titulaciones que permitan los usos del virus como se describe en la presente memoria. En una realización, la célula huésped permite que la partícula de arenavirus crezca hasta titulaciones comparables a las determinados para el tipo salvaje correspondiente.

50 En ciertas realizaciones, la partícula de arenavirus puede propagarse en células huésped. Los ejemplos específicos de células huésped que pueden usarse incluyen BHK-21, HEK 293, VERO u otras. En una realización específica, la partícula de arenavirus puede propagarse en una línea celular.

55 En ciertas realizaciones, las células huésped se mantienen en cultivo y se transfectan con uno o más plásmidos. El o los plásmidos expresan el o los segmentos genómicos de arenavirus que se generarán bajo el control de uno o más casetes de expresión adecuados para la expresión en células de mamíferos, p. ej., que consiste en un promotor y terminador de polimerasa I.

Los plásmidos que pueden usarse para la generación de la partícula de arnavirus pueden incluir: i) un plásmido que codifica el segmento genómico S, p. ej., pol-I S, ii) un plásmido que codifica el segmento genómico L, p. ej., pol-I L. En ciertas realizaciones, el plásmido que codifica una polimerasa de arnavirus que dirige la síntesis intracelular de los segmentos virales L y S puede incorporarse en la mezcla de transfección. Por ejemplo, puede estar presente un plásmido que codifica la proteína L y/o un plásmido que codifica NP (pC-L y pC-NP, respectivamente). La proteína L y NP son los factores que actúan en trans mínimos necesarios para la transcripción y replicación del ARN viral. Alternativamente, la síntesis intracelular de los segmentos L y S virales, junto con NP y la proteína L, puede realizarse usando un casete de expresión con promotores pol-I y pol-II que leen desde lados opuestos en los ADNc de los segmentos L y S de dos plásmidos separados, respectivamente.

En ciertas realizaciones, los segmentos genómicos de arnavirus están bajo el control de un promotor. Típicamente, se pueden usar casetes de expresión dirigidos por la ARN polimerasa I, casetes dirigidos por la ARN polimerasa II o casetes dirigidos por la ARN polimerasa del bacteriófago T7. En ciertas realizaciones, el o los plásmidos que codifican los segmentos genómicos de arnavirus pueden ser los mismos, es decir, la secuencia del genoma y los factores que actúan en trans pueden ser transcritos por un promotor de un plásmido. Los ejemplos específicos de promotores incluyen un promotor de ARN polimerasa I, un promotor de ARN polimerasa II, un promotor de ARN polimerasa III, un promotor T7, un promotor SP6 o un promotor T3.

Además, el o los plásmido pueden presentar un marcador de selección de mamífero, p. ej., resistencia a la puromicina, bajo el control de un casete de expresión adecuado para la expresión génica en células de mamíferos, p. ej., el casete de expresión de polimerasa II como anteriormente, o el o los transcritos génicos virales están seguidos por un sitio interno de entrada al ribosoma, tal como el del virus de la encefalomiocarditis, seguido por el marcador de resistencia de mamífero. Para la producción en *E. coli*, el plásmido presenta además un marcador de selección bacteriana, tal como un casete de resistencia a ampicilina.

La transfección de una célula huésped con un o unos plásmidos puede realizarse usando cualquiera de las estrategias usadas comúnmente, tales como fosfato de calcio, protocolos basados en liposomas o electroporación. Unos días después, se añade el agente de selección adecuado, p. ej., puromicina, en concentraciones tituladas. Los clones supervivientes se aíslan y se subclonan siguiendo procedimientos estándar, y los clones con alta expresión, se identifican usando procedimientos de citometría de flujo o transferencia Western con anticuerpos dirigidos frente a la o las proteínas virales de interés.

Para recuperar la partícula de arnavirus descrita en la presente memoria, se prevén los siguientes procedimientos. Primer día: las células, típicamente 80 % confluentes en placas de pocillos M6, se transfectan con una mezcla de los plásmidos, como se describió anteriormente. Para esto, se puede explotar cualquiera de las estrategias usadas comúnmente, tales como fosfato de calcio, protocolos basados en liposomas o electroporación.

3-5 días después: el sobrenadante cultivado (preparación del vector arnavirus) se recoge, se divide en alícuotas y se almacena a 4 ° C, -20 ° C o -80 ° C, dependiendo de cuánto tiempo se debe almacenar el vector arnavirus antes de su uso. La titulación infecciosa de la preparación del vector arnavirus se evalúa mediante un ensayo de inmunofoco. Alternativamente, las células transfectadas y el sobrenadante pueden subcultivarse en un recipiente más grande (p. ej., un matraz de cultivo de tejidos T75) en el día 3-5 después de la transfección, y el sobrenadante de cultivo se recoge hasta cinco días después del subcultivo.

La presente solicitud se refiere además a la expresión de un ORF heterólogo, en donde un plásmido que codifica el segmento genómico se modifica para incorporar un ORF heterólogo. El ORF heterólogo puede incorporarse en el plásmido usando enzimas de restricción.

(ii) Partículas de arnavirus infecciosas, deficientes para la replicación

Las partículas de arnavirus infecciosas, deficientes para la replicación, pueden rescatarse como se describió anteriormente. Sin embargo, una vez generados a partir de ADNc, los arnavirus infecciosos, deficientes para la replicación descritos en la presente memoria pueden propagarse en células complementarias. Las células complementarias son células que proporcionan la funcionalidad que se ha eliminado del arnavirus deficiente para la replicación mediante la modificación de su genoma (p. ej., si el ORF que codifica la proteína GP se deleciona o se inactiva funcionalmente, una célula complementaria proporciona la proteína GP).

Debido a la eliminación o inactivación funcional de uno o más de los ORF en vectores de arnavirus (aquí se tomará como ejemplo la delección de la glucoproteína, GP), los vectores de arnavirus pueden generarse y expandirse en células que proporcionan *en trans* el o los genes virales delecionados, p. ej., GP en el presente ejemplo. Dicha línea celular complementaria, en adelante denominada células C, se genera transfectando una línea celular tal como BHK-21, HEK 293, VERO u otra con uno o más plásmidos para la expresión del o de los genes virales de interés (plásmido de complementación, denominado plásmido C). El o los plásmidos C expresan el o los genes virales delecionados en el vector de arnavirus que se generarán bajo el control de uno o más casetes de expresión adecuados para la expresión en células de mamíferos, p. ej., un promotor de la polimerasa II de mamífero tal como el promotor EF1alfa con una señal de poliadenilación. Además, el plásmido de complementación presenta un marcador de selección de mamíferos, p. ej., resistencia a la puromicina, bajo el control de un casete de expresión adecuado para la expresión

génica en células de mamíferos, p. ej., el casete de expresión de polimerasa II como anteriormente, o el o los transcritos génicos virales están seguidos por un sitio interno de entrada al ribosoma, tal como el del virus de la encefalomiocarditis, seguido por el marcador de resistencia de mamífero. Para la producción en *E. coli*, el plásmido presenta adicionalmente un marcador de selección bacteriana, tal como un casete de resistencia a ampicilina.

- 5 Las células que se pueden usar, p. ej., BHK-21, HEK 293, MC57G u otras, se mantienen en cultivo y se transfectan con el o los plásmidos de complementación utilizando cualquiera de las estrategias usadas comúnmente, tales como fosfato de calcio, protocolos basados en liposomas o electroporación. Unos días después, se añade el agente de selección adecuado, p. ej., puromicina, en concentraciones tituladas. Los clones supervivientes se aíslan y subclonan siguiendo procedimientos estándar, y los clones de células C con alta expresión, se identifican usando procedimientos de citometría de flujo o transferencia Western con anticuerpos dirigidos frente a la o las proteínas virales de interés. Como alternativa al uso de células C transfectadas de manera estable, la transfección transitoria de células normales puede complementar el o los genes virales ausentes en cada uno de los pasos en los que las células C se utilizarán a continuación. Además, se puede usar un virus auxiliar para proporcionar la funcionalidad ausente *en trans*.

- 15 Los plásmidos pueden ser de dos tipos: i) dos plásmidos, denominados plásmidos TF para expresar intracelularmente en células C los factores que actúan *in trans* mínimos del arnavirus, se derivan de, p. ej., proteínas NP y L de LCMV en el presente ejemplo; y ii) plásmidos, denominados plásmidos GS, para expresar intracelularmente en células C los segmentos genómicos del vector de arnavirus, p. ej., los segmentos con modificaciones diseñadas. Los plásmidos TF expresan las proteínas NP y L del vector de arnavirus respectivo bajo el control de un casete de expresión adecuado para la expresión de proteínas en células de mamíferos, típicamente, p. ej., un promotor de la polimerasa II de mamífero tal como el promotor CMV o EF1 alfa, cualquiera de ellos preferentemente en combinación con una señal de poliadenilación. Los plásmidos GS expresan los segmentos genómicos pequeño (S) y grande (L) del vector. Típicamente, se pueden usar casetes de expresión dirigidos por la polimerasa I o casetes de expresión dirigidos por la ARN polimerasa de bacteriófago T7 (T7-), este último preferentemente con una ribozima 3' terminal para procesar el transcrito primario para rendir el extremo correcto. En el caso de utilizar un sistema basado en T7, la expresión de T7 en las células C debe proporcionarse incluyendo en el proceso de recuperación un plásmido de expresión adicional, construido de forma análoga a los plásmidos TF, que proporcionan T7, o las células C se construyen para expresar adicionalmente T7 de manera estable. En ciertas realizaciones, los plásmidos TF y GS pueden ser iguales, es decir, la secuencia genómica y los factores que actúan *in trans* pueden ser transcritos por los promotores T7, poll y pollI de un plásmido.

- 30 Para la recuperación del vector de arnavirus, se pueden usar los siguientes procedimientos. Primer día: las células C, típicamente 80 % confluentes en placas de pocillos M6, se transfectan con una mezcla de los dos plásmidos TF más los dos plásmidos GS. En ciertas realizaciones, los plásmidos TF y GS pueden ser iguales, es decir, la secuencia genómica y los factores que actúan *in trans* pueden ser transcritos por los promotores T7, poll y pollI de un plásmido. Para esto, se puede explotar cualquiera de las estrategias usadas comúnmente, tales como fosfato de calcio, protocolos basados en liposomas o electroporación.

- 35 3-5 días después: el sobrenadante del cultivo (preparación de vectores de arnavirus) se recoge, se divide en partes alícuotas y se almacena a 4 ° C, -20 ° C o -80 ° C, dependiendo de cuánto tiempo se debe almacenar el vector de arnavirus antes de su uso. Luego, la titulación infecciosa de la preparación del vector arnavirus se evalúa mediante un ensayo de inmunofoco en células C. Alternativamente, las células transfectadas y el sobrenadante pueden subcultivarse en un recipiente más grande (p. ej., un matraz de cultivo de tejidos T75) en el día 3-5 después de la transfección, y el sobrenadante del cultivo se recoge hasta cinco días después del subcultivo.

La descripción se refiere además a la expresión de un antígeno en un cultivo celular en donde el cultivo celular está infectado con un arnavirus infeccioso, deficiente para la replicación, que expresa un antígeno. Cuando se usa para la expresión de un antígeno en células cultivadas, se pueden usar los siguientes dos procedimientos:

- 45 i) El tipo de célula de interés se infecta con la preparación del vector de arnavirus descrita en la presente memoria a una multiplicidad de infección (MOI) de uno o más, p. ej., dos, tres o cuatro, lo que resulta en la producción del antígeno en todas las células, ya poco después de la infección.

- 50 ii) Alternativamente, se puede usar una MOI más baja y se pueden seleccionar clones de células individuales por su nivel de expresión de antígeno dirigida por virus. Posteriormente, los clones individuales pueden expandirse infinitamente debido a la naturaleza no citolítica de los vectores de arnavirus. Independientemente de la estrategia, el antígeno se puede recoger (y purificar) posteriormente bien del sobrenadante del cultivo o de las células mismas, dependiendo de las propiedades del antígeno producido. Sin embargo, la invención no se limita a estas dos estrategias, y pueden considerarse otras formas de dirigir la expresión del antígeno usando arnavirus infecciosos, deficientes para la replicación como vectores.

- 55 4.4.2 Generación de una partícula de arnavirus trisegmentada

Una partícula de arnavirus trisegmentada se puede producir de forma recombinante mediante técnicas genéticas inversas conocidas en la técnica, por ejemplo, como se describe por Emonet *et al.*, 2008, PNAS, 106 (9): 3473-3478; Popkin *et al.*, 2011, J. Virol., 85 (15): 7928-7932. La generación de la partícula de arnavirus trisegmentada

proporcionada en la presente memoria puede modificarse como se describe en la Sección 4.2.

(i) Partículas de arnavirus trisegmentadas infecciosas y competentes para la replicación

5 En ciertas realizaciones, el método para generar la partícula de arnavirus trisegmentada comprende (i) transfectar en una célula huésped los ADNc de un segmento L y dos segmentos S o dos segmentos L y un segmento S; (ii) transfectar en una célula huésped plásmidos que expresan los factores que actúan en trans mínimos del arnavirus NP y L; (iii) mantener la célula huésped en condiciones adecuadas para la formación de virus; y (iv) recoger la partícula de arnavirus.

10 Una vez generada a partir del ADNc, la partícula de arnavirus trisegmentada (es decir, infecciosa y competente para la replicación) se puede propagar. En ciertas realizaciones, la partícula de arnavirus trisegmentada puede propagarse en cualquier célula huésped que permita que el virus crezca hasta titulaciones que permitan los usos del virus como se describe en la presente memoria. En una realización, la célula huésped permite que la partícula de arnavirus trisegmentada crezca hasta titulaciones comparables a las determinadas para el tipo salvaje correspondiente.

15 En ciertas realizaciones, la partícula de arnavirus trisegmentada puede propagarse en células huésped. Los ejemplos específicos de células huésped que pueden usarse incluyen BHK-21, HEK 293, VERO u otras. En una realización específica, la partícula de arnavirus trisegmentada puede propagarse en una línea celular.

En ciertas realizaciones, las células huésped se mantienen en cultivo y se transfectan con uno o más plásmidos. El o los plásmidos expresan el o los segmentos genómicos de arnavirus que se generarán bajo el control de uno o más casetes de expresión adecuados para la expresión en células de mamíferos, p. ej., que consiste en un promotor y terminador de polimerasa I.

20 En realizaciones específicas, las células huésped se mantienen en cultivo y se transfectan con uno o más plásmidos. El o los plásmidos expresan el o los genes virales que se generarán bajo el control de uno o más casetes de expresión adecuados para la expresión en células de mamíferos, p. ej., que consiste en un promotor y terminador de polimerasa I.

25 Los plásmidos que pueden usarse para generar el arnavirus trisegmentado que comprende un segmento L y dos segmentos S pueden incluir: i) dos plásmidos que codifican cada uno el segmento del genoma S, p. ej., pol-I S, ii) un plásmido que codifica el segmento del genoma L, p. ej., pol-I L. Los plásmidos necesarios para el arnavirus trisegmentado que comprende dos segmentos L y un segmento S son: i) dos plásmidos que codifican cada uno el segmento del genoma L, p. ej., pol-L, ii) un plásmido que codifica el segmento del genoma S, p. ej., pol-I S.

30 En ciertas realizaciones, los plásmidos que codifican una polimerasa de arnavirus que dirige la síntesis intracelular de los segmentos virales L y S pueden incorporarse en la mezcla de transfección. Por ejemplo, un plásmido que codifica la proteína L y un plásmido que codifica NP (pC-L y pC-NP, respectivamente). La proteína L y NP son los factores que actúan en trans mínimos necesarios para la transcripción y replicación del ARN viral. Alternativamente, la síntesis intracelular de los segmentos virales L y S, junto con NP y la proteína L, puede realizarse usando un casete de expresión con promotores pol-I y pol-II que leen desde lados opuestos en los ADNc de los segmentos L y S de dos plásmidos separados, respectivamente.

35 Además, el o los plásmidos presentan un marcador de selección de mamífero, p. ej., resistencia a la puromicina, bajo el control de un casete de expresión adecuado para la expresión génica en células de mamífero, p. ej., el casete de expresión de polimerasa II como se indicó anteriormente, o el o los transcritos del gen viral están seguidos por un sitio interno de entrada al ribosoma, tal como el del virus de la encefalomiocarditis, seguido por el marcador de resistencia de mamíferos. Para la producción en *E. coli*, el plásmido presenta además un marcador de selección bacteriana, tal como un casete de resistencia a ampicilina.

40 La transfección de células BHK-21 con un o unos plásmidos se puede realizar utilizando cualquiera de las estrategias usadas comúnmente, tales como fosfato de calcio, protocolos basados en liposomas o electroporación. Unos días después, se añade el agente de selección adecuado, p. ej., puromicina, en concentraciones tituladas. Los clones supervivientes se aíslan y se subclonan siguiendo procedimientos estándar, y los clones con alta expresión, se identifican usando procedimientos de citometría de flujo o transferencia Western con anticuerpos dirigidos frente a la o las proteínas virales de interés.

45 Típicamente, se pueden usar casetes de expresión dirigidos por ARN polimerasa I, casetes dirigidos por ARN polimerasa II o casetes dirigidos por ARN polimerasa del bacteriófago T7, este último preferiblemente con una ribozima 3' terminal para el procesamiento del transcrito primario para rendir el extremo correcto. En ciertas realizaciones, los plásmidos que codifican los segmentos genómicos de arnavirus pueden ser los mismos, es decir, la secuencia genómica y los factores que actúan en trans pueden ser transcritos por los promotores T7, polI y polIII de un plásmido.

50 Para recuperar el arnavirus, el vector de arnavirus trisegmentado, se prevén los siguientes procedimientos. Primer día: las células, típicamente 80 % confluentes en placas de pocillos M6, se transfectan con una mezcla de los plásmidos, como se describió anteriormente. Para esto, se puede explotar cualquiera de las estrategias usadas comúnmente, tales como fosfato de calcio, protocolos basados en liposomas o electroporación.

55

3-5 días después: el sobrenadante cultivado (preparación del vector de arnavirus) se recoge, se divide en partes alícuotas y se almacena a 4 ° C, -20 ° C o -80 ° C, dependiendo de cuánto tiempo se debe almacenar el vector de arnavirus antes de su uso. La titulación infecciosa de la preparación del vector de arnavirus se evalúa mediante un ensayo de inmunofoco. Alternativamente, las células transfectadas y el sobrenadante pueden subcultivarse en un recipiente más grande (p. ej., un matraz de cultivo de tejidos T75) en el día 3-5 después de la transfección, y el sobrenadante del cultivo se recoge hasta cinco días después del subcultivo.

La presente solicitud se refiere además a la expresión de un ORF heterólogo y/o un gen de interés, en donde un plásmido que codifica el segmento genómico se modifica para incorporar un ORF heterólogo y/o un gen de interés. El ORF heterólogo y/o el gen de interés pueden incorporarse en el plásmido usando enzimas de restricción.

(ii) Partículas de arnavirus trisegmentadas infecciosas, deficientes para la replicación

Las partículas de arnavirus trisegmentadas infecciosas, deficientes para la replicación pueden rescatarse como se describió anteriormente. Sin embargo, una vez generados a partir de ADNc, los arnavirus infecciosos, deficientes para la replicación descritos en la presente memoria pueden propagarse en células complementarias. Las células complementarias son células que proporcionan la funcionalidad que se ha eliminado del arnavirus deficiente para la replicación mediante la modificación de su genoma (p. ej., si el ORF que codifica la proteína GP se deletiona o se inactiva funcionalmente, una célula complementaria proporciona la proteína GP).

Debido a la eliminación o inactivación funcional de uno o más de los ORF en vectores de arnavirus (aquí se tomará como ejemplo la delección de la glucoproteína, GP), los vectores de arnavirus pueden generarse y expandirse en células que proporcionan *en trans* el o los genes virales deletionados, p. ej., la GP en el presente ejemplo. Dicha línea celular complementaria, en lo sucesivo denominada células C, se genera transfectando una línea celular de mamífero tal como BHK-21, HEK 293, VERO u otra (aquí se tomará BHK-21 como ejemplo) con uno o más plásmidos para la expresión del o de los genes virales de interés (plásmido de complementación, denominado plásmido C). El o los plásmidos C expresan el o los genes virales deletionados en el vector de arnavirus que se generará bajo el control de uno o más casetes de expresión adecuados para la expresión en células de mamíferos, p. ej., un promotor de polimerasa II de mamífero tal como el promotor CMV o EF1 alfa con una señal de poliadenilación. Además, el plásmido de complementación presenta un marcador de selección de mamíferos, p. ej., resistencia a la puromicina, bajo el control de un casete de expresión adecuado para la expresión génica en células de mamíferos, p. ej., el casete de expresión de polimerasa II como anteriormente, o el o los transcritos génicos virales están seguidos por un sitio interno de entrada al ribosoma, tal como el del virus de la encefalomiocarditis, seguido por el marcador de resistencia de mamífero. Para la producción en *E. coli*, el plásmido presenta adicionalmente un marcador de selección bacteriana, tal como un casete de resistencia a ampicilina.

Las células que se pueden usar, p. ej., BHK-21, HEK 293, MC57G u otras, se mantienen en cultivo y se transfectan con el o los plásmidos de complementación utilizando cualquiera de las estrategias usadas comúnmente, tales como fosfato de calcio, protocolos basados en liposomas o electroporación. Unos pocos días después, se añade el agente de selección adecuado, p. ej., puromicina, en concentraciones tituladas. Los clones supervivientes se aíslan y subclonan siguiendo procedimientos estándar, y los clones de células C con alta expresión, se identifican usando procedimientos de citometría de flujo o transferencia Western con anticuerpos dirigidos frente a la o las proteínas virales de interés. Como una alternativa al uso de células C transfectadas de manera estable, la transfección transitoria de células normales puede complementar el o los genes virales ausentes en cada uno de los pasos en los que las células C se utilizarán a continuación. Además, se puede usar un virus auxiliar para proporcionar la funcionalidad ausente *en trans*.

Se pueden usar plásmidos de dos tipos: i) dos plásmidos, denominados plásmidos TF para expresar intracelularmente en células C los factores que actúan *in trans* mínimos del arnavirus, se derivan de, p. ej., NP y proteínas L de LCMV en el presente ejemplo; y ii) plásmidos, denominados plásmidos GS, para expresar intracelularmente en células C los segmentos genómicos del vector de arnavirus, p. ej., los segmentos con modificaciones diseñadas. Los plásmidos TF expresan las proteínas NP y L del vector de arnavirus respectivo bajo el control de un casete de expresión adecuado para la expresión de proteínas en células de mamíferos, típicamente, p. ej., un promotor de la polimerasa II de mamífero tal como el promotor CMV o EF1 alfa, cualquiera de ellos preferentemente en combinación con una señal de poliadenilación. Los plásmidos GS expresan los segmentos del genoma pequeño (S) y grande (L) del vector. Típicamente, se pueden usar casetes de expresión dirigidos por polimerasa I o casetes de expresión dirigidos por ARN polimerasa de bacteriófago T7 (T7-), este último preferentemente con una ribozima 3' terminal para procesar el transcrito primario para rendir el extremo correcto. En el caso de utilizar un sistema basado en T7, la expresión de T7 en las células C debe proporcionarse bien incluyendo en el proceso de recuperación un plásmido de expresión adicional, construido de forma análoga a los plásmidos TF, que proporciona T7, o las células C se construyen para expresar adicionalmente T7 de manera estable. En ciertas realizaciones, los plásmidos TF y GS pueden ser iguales, es decir, la secuencia del genoma y los factores que actúan *in trans* pueden ser transcritos por los promotores T7, poll y pollII de un plásmido.

Para la recuperación del vector de arnavirus, se pueden usar los siguientes procedimientos. Primer día: las células C, típicamente 80 % confluentes en placas de pocillos M6, se transfectan con una mezcla de los dos plásmidos TF más los dos plásmidos GS. En ciertas realizaciones, los plásmidos TF y GS pueden ser iguales, es decir, la secuencia

del genoma y los factores que actúan en trans pueden ser transcritos por los promotores T7, poll y polII de un plásmido. Para esto, se puede explotar cualquiera de las estrategias usadas comúnmente, tales como fosfato de calcio, protocolos basados en liposomas o electroporación.

5 3-5 días después: el sobrenadante del cultivo (preparación de vectores de arnavirus) se recoge, se divide en partes alícuotas y se almacena a 4 ° C, -20 ° C o -80 ° C, dependiendo de cuánto tiempo se debe almacenar el vector de arnavirus antes de su uso. Luego, la titulación infecciosa de la preparación del vector de arnavirus se evalúa mediante un ensayo de inmunofoco en células C. Alternativamente, las células transfectadas y el sobrenadante pueden subcultivarse en un recipiente más grande (p. ej., un matraz de cultivo de tejidos T75) en el día 3-5 después de la transfección, y el sobrenadante del cultivo se recoge hasta cinco días después del subcultivo.

10 La descripción se refiere además a la expresión de un antígeno en un cultivo celular en donde el cultivo celular se infecta con un arnavirus trisegmentado infeccioso, deficiente para la replicación, que expresa un antígeno. Cuando se usa para la expresión de un antígeno CMV en células cultivadas, se pueden usar los siguientes dos procedimientos:

15 i) El tipo de célula de interés se infecta con la preparación del vector de arnavirus descrita en la presente memoria a una multiplicidad de infección (MOI) de uno o más, p. ej., dos, tres o cuatro, lo que resulta en la producción del antígeno en todas las células, ya poco después de la infección.

20 ii) Alternativamente, se puede usar una MOI más baja y se pueden seleccionar clones de células individuales por su nivel de expresión de antígeno dirigida por virus. Posteriormente, los clones individuales pueden expandirse infinitamente debido a la naturaleza no citolítica de los vectores de arnavirus. Independientemente de la estrategia, el antígeno se puede recoger (y purificar) posteriormente del sobrenadante del cultivo o de las células mismas, dependiendo de las propiedades del antígeno producido. Sin embargo, la invención no se limita a estas dos estrategias, y pueden considerarse otras formas de dirigir la expresión del antígeno CMV usando arnavirus infecciosos, deficientes para la replicación, como vectores.

4.5 Ácidos nucleicos, sistemas de vectores y líneas celulares

25 En ciertas realizaciones, en la presente memoria se proporcionan ADNc que comprenden o consisten en el segmento genómico de arnavirus o la partícula de arnavirus trisegmentada como se describe en la Sección 4.1 y la Sección 4.2, respectivamente.

4.5.1 Marco de lectura abierto en una posición no natural

30 En una realización, en la presente memoria se proporcionan ácidos nucleicos que codifican un segmento genómico de arnavirus como se describe en la Sección 4.1. En ejemplos más específicos, en la presente memoria se describe una secuencia de nucleótidos de ADN o un conjunto de secuencias de nucleótidos de ADN como se muestra en la Tabla 1. Las células huésped que comprenden dichos ácidos nucleicos también se proporcionan en la Sección 4.1.

En realizaciones específicas, en la presente memoria se proporciona un ADNc del segmento genómico de arnavirus preparado por ingeniería para portar un ORF en una posición distinta de la posición de tipo salvaje del ORF, en donde el segmento genómico de arnavirus codifica un ORF heterólogo como se describe en la Sección 4.1.

35 En una realización, en la presente memoria se proporciona un sistema de vector de expresión de ADN que codifica el segmento genómico de arnavirus preparado por ingeniería para portar un ORF en una posición distinta de la posición de tipo salvaje del ORF. Específicamente, en la presente memoria se describe un sistema de vector de expresión de ADN en donde uno o más vectores codifican dos segmentos genómicos de arnavirus, a saber, un segmento L y un segmento S, de una partícula de arnavirus descrita en la presente memoria. Dicho sistema de vectores puede codificar (una o más moléculas de ADN separadas).

40 En otra realización, en la presente memoria se proporciona un ADNc del segmento S de arnavirus que se ha preparado por ingeniería para portar un ORF en una posición distinta de la posición de tipo salvaje que forma parte de o está incorporado en un sistema de expresión de ADN. En otras realizaciones, un ADNc del segmento L de arnavirus que ha sido preparado por ingeniería para portar un ORF en una posición distinta de la posición de tipo salvaje forma parte de o está incorporado en un sistema de expresión de ADN. En ciertos ejemplos, es un ADNc del segmento genómico de arnavirus que ha sido preparado por ingeniería para portar (i) un ORF en una posición distinta de la posición de tipo salvaje del ORF; y (ii) y el ORF que codifica GP, NP, la proteína Z o la proteína L se ha eliminado y reemplazado con un ORF heterólogo de otro organismo que no sea un arnavirus.

45 En ciertas realizaciones, el ADNc proporcionado en la presente memoria puede derivarse de una cepa particular de LCMV. Las cepas de LCMV incluyen Clon 13, cepa MP, Arm CA 1371, Arm E-250, WE, UBC, Traub, Pasteur, 810885, CH-5692, Marseille #12, HP65-2009, 200501927, 810362, 811316, 810316, 810366, 20112714, Douglas, GR01, SN05, CABN y sus derivados. En realizaciones específicas, el ADNc deriva del LCMV Clon 13. En otras realizaciones específicas, el ADNc deriva de la cepa MP de LCMV.

50 En ciertas realizaciones, el vector generado para codificar una partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada como se describe en la presente memoria puede basarse en una cepa específica de LCMV. Las cepas

de LCMV incluyen Clon 13, cepa MP, Arm CA 1371, Arm E-250, WE, UBC, Traub, Pasteur, 810885, CH-5692, Marseille #12, HP65-2009, 200501927, 810362, 811316, 810316, 810366, 20112714, Douglas, GR01, SN05, CABN y sus derivados. En ciertas realizaciones, una partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada como se describe en la presente memoria puede basarse en el Clon 13 de LCMV. En otras realizaciones, el vector
 5 generado para codificar una partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada como se describe en la presente memoria es la cepa MP de LCMV. La secuencia del segmento S del Clon 13 de LCMV se enumera como SEQ ID NO: 2. En ciertas realizaciones, la secuencia del segmento S del Clon 13 de LCMV es la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1. La secuencia del segmento L del Clon 13 de LCMV se enumera como SEQ ID NO: 5. La secuencia del segmento S de la cepa MP de LCMV se enumera como SEQ ID NO: 53. La secuencia del segmento L de la cepa
 10 MP de LCMV se enumera como SEQ ID NO: 4.

En otra realización, en la presente memoria se proporciona una célula, en la que la célula comprende un ADNc o un sistema de vector descrito anteriormente en esta sección. Las líneas celulares derivadas de tales células, los cultivos que comprenden tales células, los métodos de cultivo de tales células infectadas también se proporcionan en la presente memoria. En ciertas realizaciones, en la presente memoria se proporciona una célula, en la que la célula
 15 comprende un ADNc del segmento genómico de arnavirus que se ha preparado por ingeniería para portar un ORF en una posición distinta de la posición de tipo salvaje del ORF. En algunas realizaciones, la célula comprende el segmento S y/o el segmento L.

4.5.2 Partícula de arnavirus trisegmentada

En una realización, en la presente memoria se proporcionan ácidos nucleicos que codifican una partícula de arnavirus trisegmentada como se describe en la Sección 4.2. En realizaciones más específicas, en la presente memoria se proporciona una secuencia de nucleótidos de ADN o un conjunto de secuencias de nucleótidos de ADN, por ejemplo, como se muestra en la Tabla 2 o la Tabla 3. Las células huésped que comprenden dichos ácidos nucleicos también se proporcionan en la Sección 4.2.

En realizaciones específicas, en la presente memoria se proporciona un ADNc que consiste en un ADNc de la partícula de arnavirus trisegmentada que se ha preparado por ingeniería para portar un ORF en una posición distinta de la posición de tipo salvaje del ORF. En otras realizaciones, es un ADNc de la partícula de arnavirus trisegmentada que se ha preparado por ingeniería para (i) portar un ORF de arnavirus en una posición distinta de la posición de tipo salvaje del ORF; y (ii) en donde la partícula de arnavirus trisegmentada codifica un ORF heterólogo como se describe en la Sección 4.2.

En una realización, en la presente memoria se proporciona un sistema de vector de expresión de ADN que codifica conjuntamente la partícula de arnavirus trisegmentada como se describe en la presente memoria. Específicamente, en la presente memoria se proporciona un sistema de vector de expresión de ADN en donde uno o más vectores codifican tres segmentos genómicos de arnavirus, a saber, un segmento L y dos segmentos S o dos segmentos L y un segmento S de una partícula de arnavirus trisegmentada descrita en la presente memoria. Dicho sistema de vector
 35 puede codificar (una o más moléculas de ADN separadas).

En otra realización, en la presente memoria se proporciona un ADNc de o de los segmentos S de arnavirus que se ha preparado por ingeniería para portar un ORF en una posición distinta de la posición de tipo salvaje, y forma parte de o está incorporado en un sistema de expresión de ADN. En otras realizaciones, un ADNc del o de los segmentos L de arnavirus que se ha preparado por ingeniería para portar un ORF en una posición distinta de la posición de tipo salvaje forma parte de o está incorporado en un sistema de expresión de ADN. En ciertos ejemplos, es un ADNc de la partícula de arnavirus trisegmentada que ha sido preparado por ingeniería para portar (i) un ORF en una posición distinta de la posición de tipo salvaje del ORF; y (ii) un ORF que codifica GP, NP, la proteína Z o la proteína L se ha eliminado y reemplazado con un ORF heterólogo de otro organismo que no sea un arnavirus.

En ciertas realizaciones, el ADNc proporcionado en la presente memoria puede derivarse de una cepa particular de LCMV. Las cepas de LCMV incluyen Clon 13, cepa MP, Arm CA 1371, Arm E-250, WE, UBC, Traub, Pasteur, 810885, CH-5692, Marseille #12, HP65-2009, 200501927, 810362, 811316, 810316, 810366, 20112714, Douglas, GR01, SN05, CABN y sus derivados. En realizaciones específicas, el ADNc se deriva del Clon 13 de LCMV. En otras realizaciones específicas, el ADNc se deriva de la cepa MP de LCMV.

En ciertas realizaciones, el vector generado para codificar una partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada como se describe en la presente memoria puede basarse en una cepa específica de LCMV. Las cepas de LCMV incluyen Clon 13, cepa MP, Arm CA 1371, Arm E-250, WE, UBC, Traub, Pasteur, 810885, CH-5692, Marseille #12, HP65-2009, 200501927, 810362, 811316, 810316, 810366, 20112714, Douglas, GR01, SN05, CABN y sus derivados. En ciertas realizaciones, una partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada como se describe en la presente memoria puede basarse en el Clon 13 de LCMV. En otras realizaciones, el vector
 50 generado para codificar una partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada como se describe en la presente memoria es la cepa MP de LCMV. La secuencia del segmento S del Clon 13 de LCMV se enumera como SEQ ID NO: 2. En ciertas realizaciones, la secuencia del segmento S del Clon 13 de LCMV es la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1. La secuencia del segmento L del Clon 13 de LCMV se enumera como SEQ ID NO: 5. La secuencia del segmento S de la cepa MP de LCMV se enumera como SEQ ID NO: 53. La secuencia del segmento L de la cepa
 55 del segmento S de la cepa MP de LCMV se enumera como SEQ ID NO: 53. La secuencia del segmento L de la cepa

MP de LCMV se enumera como SEQ ID NO: 4.

5 En otra realización, en la presente memoria se proporciona una célula, en la que la célula comprende un ADNc o un sistema de vector descrito anteriormente en esta sección. Las líneas celulares derivadas de tales células, los cultivos que comprenden tales células, los métodos de cultivo de tales células infectadas también se proporcionan en la presente memoria. En ciertas realizaciones, en la presente memoria se proporciona una célula, en la que la célula comprende un ADNc de la partícula de arnavirus trisegmentada. En algunas realizaciones, la célula comprende el segmento S y/o el segmento L.

4.6 Métodos de uso

10 Las vacunas han tenido éxito para prevenir y/o tratar enfermedades infecciosas, tales como las del virus de la polio y el sarampión. Sin embargo, la inmunización terapéutica en el contexto de una enfermedad crónica establecida, que incluye tanto infecciones crónicas como cáncer, ha tenido menos éxito. La capacidad de generar una partícula de arnavirus y/o una partícula de arnavirus trisegmentada representa una nueva estrategia de vacuna novedosa.

15 En una realización, los métodos para tratar una infección y/o cáncer en un sujeto comprenden administrar al sujeto uno o más tipos de partículas de arnavirus o partículas de arnavirus trisegmentadas, como se describe en la presente memoria o una composición de las mismas. En una realización específica, un método para tratar una infección y/o cáncer descrito en la presente memoria comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad efectiva de una o más partículas de arnavirus o partículas de arnavirus trisegmentadas, descritas en la presente memoria o una composición de las mismas. El sujeto puede ser un mamífero, tal como, pero no limitado a, un ser humano, un ratón, una rata, un conejillo de indias, un animal domesticado, tal como, pero no limitado a, una vaca, un caballo, una oveja, un cerdo, una cabra, un gato, un perro, un hámster, un burro. En una realización específica, el sujeto es un ser humano. El sujeto humano podría ser hombre, mujer, adultos, niños, personas mayores (65 años o más) y personas con múltiples enfermedades (es decir, un sujeto polimórbido). En ciertas realizaciones, los sujetos son aquellos cuya enfermedad ha progresado después del tratamiento con quimioterapia, radioterapia, cirugía y/o agentes biológicos.

25 En otra realización, los métodos para inducir una respuesta inmune frente a un antígeno derivado de un organismo infeccioso, tumor o alérgeno en un sujeto comprenden administrar al sujeto una partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado de un organismo infeccioso, tumor o alérgeno o una composición del mismo.

30 En otra realización, los sujetos a quienes se administra una partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado de un organismo infeccioso, tumor o alérgeno descrito en la presente memoria o una composición de la misma, son susceptibles o están en riesgo de sufrir una infección, desarrollo de cáncer o alergia, o exhiben una lesión de tejido precancerosa. En otra realización específica, los sujetos a los que se administra una partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado de un organismo infeccioso, tumor o alérgeno descrito en la presente memoria o una composición de la misma están infectados con, son susceptibles de, están en riesgo de, o han sido diagnosticados con, una infección, cáncer, lesión de tejido precancerosa o alergia.

40 En otra realización, los sujetos a los que se administra una partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado de un organismo infeccioso, tumor o alérgeno descrito en la presente memoria o una composición de la misma, padecen, son susceptibles de o están en riesgo de, una infección, un cáncer, una lesión precancerosa o una alergia en el sistema pulmonar, el sistema nervioso central, el sistema linfático, el sistema gastrointestinal o el sistema circulatorio, entre otros. En una realización específica, los sujetos a los que se administra una partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado de un organismo infeccioso, tumor o alérgeno descrito en la presente memoria o una composición de la misma padecen, son susceptibles a o están en riesgo de, una infección, un cáncer o una alergia en uno o más órganos del cuerpo, incluidos, pero no limitado a, el cerebro, el hígado, los pulmones, los ojos, los oídos, los intestinos, el esófago, el útero, la nasofaringe o las glándulas salivares.

50 En otra realización, los sujetos a los que se administra una partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado de un organismo infeccioso, un cáncer o un alérgeno descrito en la presente memoria o una composición de la misma a un sujeto que padece síntomas que incluyen, pero no se limitan a, fiebre, sudores nocturnos, cansancio, malestar, inquietud, dolor de garganta, glándulas inflamadas, dolor en las articulaciones, dolor muscular, pérdida de apetito, pérdida de peso, diarrea, úlceras gastrointestinales, sangrado gastrointestinal, dificultad para respirar, neumonía, úlceras bucales, problemas de visión, hepatitis, ictericia, encefalitis, convulsiones, coma, prurito, eritema, hiperpigmentación, cambios en los ganglios linfáticos o pérdida auditiva.

55 En otra realización, un arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado de un organismo infeccioso, un cáncer o un alérgeno como se describe en la presente memoria o una composición de la misma se administra a un sujeto de cualquier grupo de edad que padece, es susceptible a, o está en riesgo de, contraer una infección, un cáncer o una alergia. En una realización específica, una partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado de un organismo infeccioso, un cáncer o un alérgeno

como se describe en la presente memoria o una composición de la misma se administra a un sujeto con un sistema inmune comprometido, una embarazada, un sujeto sometido a un trasplante de órgano o médula ósea, un sujeto que toma medicamentos inmunosupresores, un sujeto sometido a hemodiálisis, un sujeto que tiene cáncer o un sujeto que padece, es susceptible a o está en riesgo de contraer una infección, un cáncer o una alergia. En una realización más específica, una partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado de un organismo infeccioso, un cáncer o un alérgeno como se describe en la presente memoria o una composición de la misma se administra a un sujeto que es un niño de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 años de edad que padece, es susceptible a o está en riesgo de contraer, una infección, un cáncer o una alergia. En otra realización específica más, una partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado de un organismo infeccioso, un cáncer o un alérgeno descrito en la presente memoria o una composición de la misma se administra a un sujeto que padece, es susceptible a o está en riesgo de contraer una infección, cáncer o una alergia. En otra realización específica más, una partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado de un organismo infeccioso, un cáncer o un alérgeno descrito en la presente memoria o una composición de la misma se administra a un sujeto que es un bebé de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses de edad que padece, es susceptible a o está en riesgo de, contraer una infección, cáncer o alergia. En otra realización específica más, una partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado de un organismo infeccioso, un cáncer o un alérgeno descrito en la presente memoria o una composición de la misma se administra a un sujeto anciano que padece, es susceptible a, o está en riesgo de, contraer una infección, cáncer o una alergia. En una realización más específica, una partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado de un organismo infeccioso, un cáncer o un alérgeno descrito en la presente memoria o una composición de la misma se administra a un sujeto que es un sujeto mayor de 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89 o 90 años de edad.

En otra realización, una partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado de un organismo infeccioso, un cáncer o un alérgeno descrito en la presente memoria o una composición de la misma se administra a sujetos con un mayor riesgo de infección diseminada, un cáncer o una alergia. En una realización específica, la partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado de un organismo infeccioso, un cáncer o un alérgeno descrito en la presente memoria o una composición de la misma se administra a sujetos en el período neonatal con un sistema inmune neonatal y, por lo tanto, inmaduro.

En otra realización, una partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado de un organismo infeccioso, un cáncer o un alérgeno como se describe en la presente memoria o una composición de la misma se administra a un sujeto que tiene una infección latente, cáncer o alergia. En una realización específica, una partícula de arnavirus o un arnavirus trisegmentado que expresa un antígeno derivado de un organismo infeccioso, un cáncer o un alérgeno descrito en la presente memoria o una composición de la misma se administra a un sujeto que tiene una infección latente, un cáncer latente o una alergia latente que puede reactivarse al comprometer el sistema inmunitario. Por lo tanto, en la presente memoria se proporciona un método para prevenir la reactivación de una infección, un cáncer o una alergia.

En otra realización, una partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado de un organismo infeccioso, un cáncer o un alérgeno como se describe en la presente memoria o una composición de la misma se administra a un sujeto que tiene una infección recurrente, un cáncer o una alergia.

En otra realización, una partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado de un organismo infeccioso, un cáncer o un alérgeno como se describe en la presente memoria o una composición de la misma se administra a un sujeto con una predisposición genética para una infección, un cáncer o alergia. En otra realización, una partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado de un organismo infeccioso, un cáncer o un alérgeno como se describe en la presente memoria o una composición de la misma se administra a un sujeto. En otra realización, una partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado de un organismo infeccioso, un cáncer o un alérgeno se administra a un sujeto con factores de riesgo. Los factores de riesgo ejemplares incluyen envejecimiento, tabaco, exposición al sol, exposición a la radiación, exposición química, antecedentes familiares, alcohol, mala alimentación, falta de actividad física o sobrepeso.

En otra realización, la administración de una partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado de un organismo infeccioso, un cáncer o un alérgeno reduce una infección sintomática, cáncer o alergia. En otra realización, la administración de una partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado de un organismo infeccioso, un cáncer o un alérgeno reduce una infección asintomática, cáncer o alergia.

En otra realización, una partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado de un organismo infeccioso descrito en la presente memoria o una composición de la misma se administra a sujetos o animales infectados con una o más cepas de virus de la gripe, virus de la enfermedad de la bolsa infecciosa, rotavirus, virus de la bronquitis infecciosa, virus de la laringotraqueitis infecciosa, virus de la anemia del pollo, virus de la enfermedad de Marek, virus de la leucosis aviar, adenovirus aviar o neumovirus aviar, virus causante del SARS, virus sincitial respiratorio humano, virus de la inmunodeficiencia humana, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis

B, virus de la hepatitis C, poliovirus, virus de la rabia, virus Hendra, virus Nipah, virus de la parainfluenza humana 3, virus del sarampión, virus de las paperas, virus del Ébola, virus de Marburg, virus de la enfermedad del Nilo Occidental, virus de la encefalitis japonesa, virus del dengue, hantavirus, virus de la fiebre del Valle del Rift, virus de la fiebre de Lassa, virus del herpes simple y virus de la fiebre amarilla.

5 En otra realización, una partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado de un cáncer descrito en la presente memoria o una composición de la misma se administra a sujetos que padecen uno o más tipos de cánceres. En otras realizaciones, cualquier tipo de cáncer susceptible de tratamiento con las vacunas descritas en la presente memoria podría ser un objetivo. En una realización más específica, una partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado de un cáncer descrito
10 en la presente memoria o una composición de la misma se administra a sujetos que padecen, por ejemplo, melanoma, carcinoma de próstata, carcinoma de mama, carcinoma de pulmón, neuroblastoma, carcinoma hepatocelular, carcinoma de cuello uterino y carcinoma de estómago, linfoma de Burkitt; linfoma no de Hodgkin; linfoma de Hodgkin; carcinoma nasofaríngeo (cáncer de la parte superior de la garganta detrás de la nariz), leucemia, linfoma de tejido linfoide asociado a la mucosa.

15 En otra realización, una partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado de un alérgeno descrito en la presente memoria o una composición de la misma se administra a sujetos que padecen una o más alergias. En una realización más específica, una partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado de un alérgeno descrito en la presente memoria o una
20 composición de la misma se administra a sujetos que padecen, por ejemplo, una alergia estacional, una alergia perenne, rinoconjuntivitis, asma, eczema, una alergia alimentaria.

En otra realización, la administración de una partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado de un organismo infeccioso, un cáncer o un alérgeno como se describe en la presente memoria o una composición de la misma a sujetos que confiere inmunidad mediada por células (CMI) frente a una infección, un cáncer o un alérgeno. Sin estar limitado por la teoría, en otra realización, una partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado de un organismo infeccioso, un cáncer,
25 un alérgeno como se describe en la presente memoria o una composición de la misma infecta y expresa antígenos de interés en las células presentadoras de antígenos (APC) del huésped (p. ej., macrófagos, células dendríticas o células B) para la presentación directa de antígenos en el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I y II. En otra realización, la administración de una partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado de un organismo infeccioso, un cáncer, un alérgeno como se describe en la presente memoria o una composición de la misma a sujetos induce respuestas de células T CD4+ y CD8+ citolíticas plurifuncionales, así como específicas de CMV que coproducen IFN- γ y TNF- α de gran magnitud para tratar o prevenir una infección, un
30 cáncer o una alergia.

En otra realización, la administración de una partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado de un organismo infeccioso, un cáncer o un alérgeno o una composición de la misma reduce el riesgo de que un individuo desarrolle una infección, un cáncer o una alergia. en al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 25 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 35 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 60 %, a al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un
35 80 %, al menos aproximadamente un 90 % o más, en comparación con el riesgo de desarrollar una infección, un cáncer o una alergia en ausencia de dicho tratamiento.

En otra realización, la administración de una partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado de un organismo infeccioso, un cáncer o un alérgeno o una composición de la misma reduce los síntomas de una infección, un cáncer o una alergia al menos aproximadamente un 10 %, al menos
40 aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 25 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 35 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 % o más, en comparación con la manifestación de los síntomas de una infección, un cáncer, una alergia en ausencia de dicho tratamiento.

En ciertas realizaciones, la partícula de arnavirus o la partícula de arnavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado de un organismo infeccioso, un cáncer o un alérgeno se administra preferiblemente en inyecciones múltiples (p. ej., al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 40, 45 o 50 inyecciones) o por infusión continua (p. ej., usando una bomba) en múltiples sitios (p. ej., al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 o 14 sitios). En ciertas realizaciones, la partícula de arnavirus o la partícula de arnavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado
45 de un organismo infeccioso, un cáncer o un alérgeno se administra en dos o más inyecciones separadas durante un período de 6 meses, un período de 12 meses, un período de 24 meses, o un período de 48 meses. En ciertas realizaciones, la partícula de arnavirus o la partícula de arnavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado de un organismo infeccioso, un cáncer o un alérgeno se administra con una primera dosis en una fecha elegida, una segunda dosis al menos 2 meses después de la primera dosis, y una tercera dosis 6 meses después de la primera
50 dosis.

En un ejemplo, las inyecciones cutáneas se realizan en múltiples sitios del cuerpo para reducir el alcance de las reacciones cutáneas locales. En un día de vacunación dado, el paciente recibe la dosis total asignada de células administrada de una jeringa en 3 a 5 inyecciones intradérmicas separadas de la dosis (p. ej., al menos 0,4 ml, 0,2 ml o 0,1 ml) cada una en una extremidad espaciada al menos aproximadamente 5 cm (p. ej., al menos 4,5, 5, 6, 7, 8, 9 o cm) en la entrada de la aguja desde la inyección vecina más cercana. En los días de vacunación posteriores, los sitios de inyección se rotan a diferentes extremidades en sentido horario o antihorario.

En otra realización, la administración de un arnavirus infeccioso, deficiente para la replicación, que expresa un antígeno CMV o una composición del mismo en sujetos con un sistema neonatal y por lo tanto inmaduro induce una respuesta inmune mediada por células (CMI) frente a una infección, un cáncer o una alergia, superior en al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 25 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 35 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 % o más, de la respuesta de CMI frente a una infección, un cáncer o una alergia en ausencia de dicho tratamiento.

En ciertas realizaciones, la administración a un sujeto de una partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado de un organismo infeccioso, un cáncer o un alérgeno, como se describe en la presente memoria, induce una titulación de anticuerpo detectable durante un mínimo de al menos cuatro semanas. En otra realización, la administración a un sujeto de una partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado de un organismo infeccioso, un cáncer o un alérgeno, como se describe en la presente memoria, aumenta la titulación de anticuerpos en al menos un 100 %, al menos un 200 %, al menos un 300 %, al menos un 400 %, al menos un 500 % o al menos un 1.000%.

En ciertas realizaciones, la exposición primaria al antígeno incita una titulación de anticuerpos funcional (neutralizante) y mínima de al menos un 50 %, al menos un 100 %, al menos un 200 %, al menos un 300 %, al menos un 400 %, al menos un 500 %, o al menos un 1.000 % del suero de control medio de sujetos humanos inmunes a la infección. En realizaciones más específicas, la media geométrica de la titulación de anticuerpos primarios neutralizantes aumenta hasta un valor máximo de al menos 1:50, al menos 1:100, al menos 1:200 o al menos 1:1.000 dentro de al menos 4 semanas después de inmunización. En otra realización, la inmunización con una partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado de un organismo infeccioso, un cáncer o una alergia, como se describe en la presente memoria, produce titulaciones elevadas de anticuerpos que duran al menos 4 semanas, al menos 8 semanas, al menos 12 semanas, al menos 6 meses, al menos 12 meses, al menos 2 años, al menos 3 años, al menos 4 años o al menos 5 años después de la inmunización después de una sola administración de la vacuna, o después de dos o más inmunizaciones secuenciales.

En otra realización más, la exposición secundaria al antígeno aumenta la titulación de anticuerpos en al menos un 100 %, al menos un 200 %, al menos un 300 %, al menos un 400 %, al menos un 500 % o al menos un 1.000 %. En otra realización, la exposición secundaria al antígeno incita una titulación de anticuerpos funcionales (neutralizantes) y mínima de al menos un 50 %, al menos un 100 %, al menos un 200 %, al menos un 300 %, al menos un 400 %, al menos un 500 %, o al menos un 1.000 % del suero de control medio de sujetos humanos inmunes a la infección. En realizaciones más específicas, la media geométrica de la titulación de anticuerpos secundarios neutralizantes aumenta hasta un valor máximo de al menos 1:50, al menos 1:100, al menos 1:200 o al menos 1:1.000 dentro de al menos 4 semanas después de inmunización. En otra realización, una segunda inmunización con una partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado de un organismo infeccioso, un cáncer o una alergia, como se describe en la presente memoria, produce altas titulaciones altas de anticuerpos que duran al menos 4 semanas, al menos 8 semanas, al menos 12 semanas, al menos 6 meses, al menos 12 meses, al menos 2 años, al menos 3 años, al menos 4 años o al menos 5 años después de la inmunización.

En otra realización más, una tercera inmunización de refuerzo aumenta la titulación de anticuerpos en al menos un 100 %, al menos un 200 %, al menos un 300 %, al menos un 400 %, al menos un 500 % o al menos un 1.000 %. En otra realización, la inmunización de refuerzo incita una titulación de anticuerpos funcionales (neutralizantes) y mínima de al menos un 50 %, al menos un 100 %, al menos un 200 %, al menos un 300 %, al menos un 400 %, al menos un 500 %, o al menos un 1.000 % del suero control medio de sujetos humanos inmunes a la infección. En realizaciones más específicas, la tercera inmunización de refuerzo incita una titulación de anticuerpos funcionales (neutralizantes) y mínima de al menos un 50 %, al menos un 100 %, al menos un 200 %, al menos un 300 %, al menos un 400 %, al menos un 500 %, o al menos un 1.000 % del suero control medio de sujetos humanos inmunes a la infección. En otra realización, una tercera inmunización de refuerzo prolonga la titulación de anticuerpos en al menos 4 semanas, al menos 8 semanas, al menos 12 semanas, al menos 6 meses, al menos 12 meses, al menos 2 años, al menos 3 años, al menos 4 años, o al menos 5 años después de la inmunización

En ciertas realizaciones, la partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado de un organismo infeccioso, un cáncer o una alergia, incita una respuesta independiente de células T o dependiente de células T. En otras realizaciones, la partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado de un organismo infeccioso, un cáncer o una alergia, incita una respuesta de células T. En otras realizaciones, una partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado de un organismo infeccioso, un cáncer o una alergia, como se describe en la

presente memoria, incita una respuesta T auxiliar. En otra realización, la partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado de un organismo infeccioso, un cáncer o una alergia, como se describe en la presente memoria, incita una respuesta orientada a Th1 o una respuesta orientada a Th2.

5 En realizaciones más específicas, la respuesta orientada a Th1 está indicada por un predominio de anticuerpos IgG1 frente a IgG2. En otras realizaciones, la proporción de IgG1:IgG2 es mayor de 1:1, mayor de 2:1, mayor de 3:1 o mayor de 4:1. En otra realización, la partícula de arnavirus infecciosa o una arena de arnavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado de un organismo infeccioso, un cáncer o una alergia, como se describe en la presente memoria, se indica mediante un predominio de anticuerpos IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA, IgD o IgE.

10 En algunas realizaciones, el arnavirus infeccioso, deficiente para la replicación, que expresa un antígeno CMV o un fragmento del mismo incita una respuesta de células T CD8+. En otra realización, la partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado de un organismo infeccioso, un cáncer o una alergia incita respuestas tanto de células T CD4+ como CD8+, en combinación o no con anticuerpos.

15 En ciertas realizaciones, la partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado de un organismo infeccioso, un cáncer o una alergia, como se describe en la presente memoria, incita titulaciones altas de anticuerpos neutralizantes. En otra realización, la partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado de un organismo infeccioso, un cáncer o una alergia, como se describe en la presente memoria, incita titulaciones más altas de anticuerpos neutralizantes que la expresión de los componentes del complejo proteico individualmente.

20 En otra realización, la partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada que expresa uno, dos, tres, cuatro, cinco o más antígenos derivados de un organismo infeccioso, un cáncer o una alergia incita titulaciones más altas de anticuerpos neutralizantes que una partícula de arnavirus. o una partícula de arnavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado de un organismo infeccioso, un cáncer o un alérgeno.

25 En ciertas realizaciones, los métodos comprenden además la coadministración de la partícula de arnavirus o partícula de arnavirus trisegmentada y al menos una terapia adicional. En ciertas realizaciones, la coadministración es simultánea. En otra realización, la partícula de arnavirus o la partícula de arnavirus trisegmentada se administra antes de la administración de la terapia adicional. En otras realizaciones, la partícula de arnavirus o la partícula de arnavirus trisegmentada se administra después de la administración de la terapia adicional. En ciertas realizaciones, la administración de la partícula de arnavirus o partícula de arnavirus trisegmentada y la terapia adicional es aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 9 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 11 horas o aproximadamente 12 horas. En ciertas realizaciones, el intervalo entre la administración de la partícula de arnavirus o la partícula de arnavirus trisegmentada y dicha terapia adicional es aproximadamente 1 día, 1 semana, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 5 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 7 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 9 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 11 semanas, aproximadamente 12 semanas. En ciertas realizaciones, el intervalo entre la administración de la partícula de arnavirus o la partícula de arnavirus trisegmentada y la terapia adicional es de aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses o aproximadamente 6 meses.

40 En ciertas realizaciones, la administración de una partícula de arnavirus que expresa un antígeno derivado de un organismo infeccioso, un cáncer o un alérgeno o una composición de la misma reduce el número de anticuerpos detectados en una muestra de sangre o muestra de suero del paciente. En ciertas realizaciones, la administración de una partícula de arnavirus que expresa un antígeno derivado de un organismo infeccioso, un cáncer o un alérgeno o composición de la misma reduce la cantidad de organismo infeccioso, cáncer o alergia detectada en orina, saliva, sangre, lágrimas, semen, muestra celular exfoliada o leche materna.

50 En otra realización, la partícula de arnavirus o la partícula de arnavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado de un organismo de infección, un cáncer o un alérgeno como se describe en la presente memoria o una composición puede comprender además una proteína informadora. En una realización más específica, la partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado de un organismo de infección, un cáncer o un alérgeno y una proteína informadora como se describe en la presente memoria o una composición se administra a sujetos para tratar y/o prevenir una infección, un cáncer o una alergia. En otra realización específica más, la proteína informadora puede usarse para monitorizar la expresión génica, la localización de proteínas y la administración de vacunas, *in vivo*, *in situ* y en tiempo real.

55 En otra realización, la partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado de un organismo de infección, un cáncer o un alérgeno como se describe en la presente memoria o una composición puede comprender además una proteína fluorescente. En una realización más específica, la partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado de un organismo de infección, un cáncer, o un alérgeno y una proteína informadora como se describe en la presente memoria o una composición se administra a sujetos para tratar y/o prevenir una infección, un cáncer o una alergia. En otra realización

específica más, la proteína fluorescente puede ser la proteína informadora que se puede usar para monitorizar la expresión génica, la localización de proteínas y la administración de vacunas, *in vivo*, *in situ* y en tiempo real.

5 Los cambios en la función de la respuesta de CMI frente a una infección, un cáncer o una alergia inducida por la administración de una partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada que expresa un antígeno derivado de un organismo infeccioso, un cáncer, un alérgeno o una composición de la misma en sujetos pueden medirse mediante cualquier ensayo conocido por el experto en la técnica, que incluye, pero no se limita a citometría de flujo (véase, p. ej., Perfetto S.P. *et al.*, 2004, *Nat Rev Immun.*, 4 (8): 648-55), ensayos de proliferación de linfocitos (véase, p. ej., Bonilla F.A. *et al.*, 2008, *Ann Allergy Asthma Immunol.*, 101: 101-4; y Hicks M.J. *et al.*, 1983, *Am J Clin Pathol.*, 80: 159-63), ensayos para medir la activación de linfocitos, incluida la determinación de cambios en la expresión de marcadores de superficie después de la activación de la medición de citoquinas de linfocitos T (véase, p. ej., Caruso A. *et al.*, *Cytometry.* 1997; 27: 71-6), ensayos ELISPOT (véase, p. ej., Czerkinsky C.C. *et al.*, 1983, *J Immunol Methods*, 65: 109-121; y Hutchings P.R. *et al.*, 1989, *J Immunol Methods*, 120: 1-8) o ensayos de citotoxicidad de células asesinas naturales (véase, p. ej., Bonilla F.A. *et al.*, 2006, *Ann Allergy Asthma Immunol.*, 94 (5 Supl 1): S1-63).

15 El tratamiento exitoso de un paciente con cáncer se puede evaluar como la prolongación de la supervivencia esperada, la inducción de una respuesta inmune antitumoral o la mejora de una característica particular de un cáncer. Los ejemplos de características de un cáncer que podrían mejorarse incluyen el tamaño del tumor (p. ej., T0, T es o T1-4), estado de metástasis (p. ej., M0, M1), número de tumores observables, afectación ganglionar (p. ej., N0, N1-4, Nx), grado (es decir, grados 1, 2, 3 o 4), estadio (p. ej., 0, I, II, III o IV), presencia o concentración de ciertos marcadores en las células o en los fluidos corporales (p. ej., AFP, B2M, beta-HCG, BTA, CA 15-3, CA 27.29, CA 125, CA 72.4, CA 19-9, calcitonina, CEA, cromograinina A, EGFR, receptores hormonales, HER2, HCG, inmunoglobulinas, NSE, NMP22, PSA, PAP, PSMA, S-100, TA-90 y tiroglobulina), y/o patologías asociadas (p. ej., ascitis o edema) o síntomas (p. ej., caquexia, fiebre, anorexia o dolor). La mejora, si se puede medir por porcentaje, puede ser de al menos un 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90 % (p. ej., supervivencia, o volumen o dimensiones lineales de un tumor).

25 En otra realización, en la presente memoria se describe un método de uso con una partícula de arnavirus (p. ej., LCMV) que expresa un antígeno derivado de un organismo infeccioso, un cáncer o un alérgeno como se describe en la presente memoria en donde el al menos uno de los ORF que codifica GP, NP, la proteína Z y la proteína L se sustituye con una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de nucleótidos infecciosa que codifica un antígeno derivado de un organismo infeccioso, un cáncer, un alérgeno o un fragmento antigénico del mismo.

30 4.7 Composiciones, administración y dosificación

La presente solicitud se refiere además a vacunas, composiciones inmunogénicas (p. ej., formulaciones de vacunas) y composiciones farmacéuticas que comprenden una partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada como se describe en la presente memoria. Dichas vacunas, composiciones inmunogénicas y composiciones farmacéuticas pueden formularse de acuerdo con procedimientos estándar en la técnica.

35 Será evidente para un experto en las técnicas relevantes que las modificaciones y adaptaciones adecuadas a los métodos y aplicaciones descritos en la presente memoria pueden ser obvias y pueden realizarse sin apartarse del alcance del alcance o de cualquier realización del mismo.

40 En otra realización, en la presente memoria se proporcionan composiciones que comprenden una partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada descrita en la presente memoria. Dichas composiciones pueden usarse en métodos de tratamiento y prevención de enfermedades. En una realización específica, las composiciones descritas en la presente memoria se usan en el tratamiento de sujetos infectados con, o susceptibles a, una infección. En otras realizaciones, las composiciones descritas en la presente memoria se usan en el tratamiento de sujetos susceptibles a, o que presentan síntomas característicos de, cáncer o tumorigénesis o se les ha diagnosticado cáncer. En otra realización específica, las composiciones inmunogénicas proporcionadas en la presente memoria pueden usarse para inducir una respuesta inmune en un huésped al que se administra la composición. Las composiciones inmunogénicas descritas en la presente memoria pueden usarse como vacunas y, en consecuencia, pueden formularse como composiciones farmacéuticas. En una realización específica, las composiciones inmunogénicas descritas en la presente memoria se usan en la prevención de infección o cáncer de sujetos (p. ej., sujetos humanos). En otras realizaciones, la vacuna, la composición inmunogénica o la composición farmacéutica son adecuadas para la administración veterinaria y/o humana.

55 En ciertas realizaciones, en la presente memoria se proporcionan composiciones inmunogénicas que comprenden un vector de arnavirus como se describe en la presente memoria. En ciertas realizaciones, dicha composición inmunogénica comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, dicha composición inmunogénica comprende además un adyuvante. El adyuvante para administración en combinación con una composición descrita en la presente memoria puede administrarse antes de, concomitantemente con o después de, la administración de dicha composición. En algunas realizaciones, el término "adyuvante" se refiere a un compuesto que cuando se administra junto con o como parte de una composición descrita en la presente memoria aumenta, potencia y/o refuerza la respuesta inmune frente a una partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada y, lo más importante, los productos genéticos que vectoriza, pero cuando el compuesto se administra

solo no genera una respuesta inmune frente a la partícula de arnavirus o partícula de arnavirus trisegmentada y los productos génicos vectorizados por este último. En algunas realizaciones, el adyuvante genera una respuesta inmune frente a la partícula de arnavirus o partícula de arnavirus trisegmentada y frente a los productos génicos vectorizados por esta última y no produce una alergia u otra reacción adversa. Los adyuvantes pueden potenciar una respuesta inmune mediante varios mecanismos que incluyen, p. ej., reclutamiento de linfocitos, estimulación de células B y/o T, y estimulación de macrófagos o células dendríticas. Cuando una vacuna o composición inmunogénica de la invención comprende adyuvantes o se administra junto con uno o más adyuvantes, los adyuvantes que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, adyuvantes de sal mineral o adyuvantes de gel de sal mineral, adyuvantes particulados, adyuvantes microparticulados, adyuvantes mucosales y adyuvantes inmunoestimuladores. Los ejemplos de adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, sales de aluminio (alumbre) (tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y sulfato de aluminio), monofosforil lípido A (MPL) 3 De-O-acilado (véase GB 2220211), MF59 (Novartis), AS03 (GlaxoSmithKline), AS04 (GlaxoSmithKline), polisorbato 80 (Tween 80; ICL Americas, Inc.), compuestos de imidazopiridina (véase la Solicitud Internacional No. PCT/US2007/064857, publicada como Publicación Internacional No. WO2007/109812), compuestos de imidazoquinoxalina (véase la Solicitud internacional no. PCT/US2007/064858, publicada como Publicación Internacional No. WO2007/109813) y saponinas, tales como QS21 (véase Kensil *et al.*, 1995, en Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell y Newman, Plenum Press, NY); Pat. de EE. UU. No. 5.057.540). En algunas realizaciones, el adyuvante es el adyuvante de Freund (completo o incompleto). Otros adyuvantes son las emulsiones de aceite en agua (tales como el escualeno o el aceite de cacahuete), opcionalmente en combinación con estimulantes inmunes, tales como el monofosforil lípido A (véase, Stoute *et al.*, 1997, N. Engl. J. Med. 336, 86-91).

Las composiciones comprenden la partícula de arnavirus o la partícula de arnavirus trisegmentada descrita en la presente memoria sola o junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se pueden usar suspensiones o dispersiones de la partícula de arnavirus o partícula de arnavirus trisegmentada, especialmente suspensiones o dispersiones acuosas isotónicas. Las composiciones farmacéuticas pueden esterilizarse y/o pueden comprender excipientes, p. ej., conservantes, estabilizantes, agentes humectantes y/o emulsionantes, solubilizantes, sales para regular la presión osmótica y/o tampones y se preparan de una manera conocida per se, por ejemplo, por medios de dispersión convencional y procesos de suspensión. En ciertas realizaciones, tales dispersiones o suspensiones pueden comprender agentes reguladores de la viscosidad. Las suspensiones o dispersiones se mantienen a temperaturas de alrededor de 2° C a 8° C, o preferiblemente para un almacenamiento más prolongado pueden congelarse y luego descongelarse poco antes de su uso, o alternativamente pueden liofilizarse para su almacenamiento. Para inyección, la vacuna o las preparaciones inmunogénicas pueden formularse en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como la solución de Hanks, la solución de Ringer o el tampón salino fisiológico. La solución puede contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

En ciertas realizaciones, las composiciones descritas en la presente memoria comprenden adicionalmente un conservante, p. ej., el derivado de mercurio timerosal. En una realización específica, las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria comprenden timerosal del 0,001 % al 0,01 %. En otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria no comprenden un conservante.

Las composiciones farmacéuticas comprenden de aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^{11} unidades formadoras de focos de la partícula de arnavirus o partícula de arnavirus trisegmentada.

En una realización, la administración de la composición farmacéutica es administración parenteral. La administración parenteral puede ser administración intravenosa o subcutánea. En consecuencia, las formas de dosis unitarias para administración parenteral son, por ejemplo, ampollas o viales, p. ej., viales que contienen aproximadamente 10^3 a 10^{10} unidades formadoras de focos o 10^5 a 10^{15} partículas físicas de la partícula arnavirus o partícula arnavirus trisegmentada.

En otra realización, una vacuna o composición inmunogénica proporcionada en la presente memoria se administra a un sujeto por las rutas, incluyendo, pero no limitado a, oral, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, tópica, subcutánea, percutánea, intranasal e inhalación, y mediante escarificación (rascado a través de las capas superiores de la piel, p. ej., utilizando una aguja bifurcada). Específicamente, se pueden usar las rutas subcutánea o intravenosa.

Para la administración por vía intranasal o por inhalación, la preparación para su uso de acuerdo con la presente invención puede administrarse convenientemente en la forma de una presentación de pulverización de aerosol de envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, p. ej., diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. Pueden formularse cápsulas y cartuchos de, p. ej., gelatina para usar en un inhalador o insufladores que contienen una mezcla en polvo del compuesto y como una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

La dosificación del ingrediente activo depende del tipo de vacunación y del sujeto, y su edad, peso, condición individual, los datos farmacocinéticos individuales y el modo de administración. En ciertas realizaciones, se emplea un ensayo *in vitro* para ayudar a identificar rangos de dosificación óptimos. Las dosis efectivas pueden extrapolarse a partir de las

curvas de respuesta a la dosis, derivadas de sistemas de ensayo de modelos en animales *in vitro*.

En ciertas realizaciones, la vacuna, composición inmunogénica o composición farmacéutica que comprende una partícula de arnavirus o la partícula de arnavirus trisegmentada se puede usar como una vacuna viva. Las dosis ejemplares para una partícula de arnavirus viva pueden variar de 10 a 100, o más, PFU de virus vivo por dosis. En algunas realizaciones, las dosis adecuadas de una partícula de arnavirus o la partícula de arnavirus trisegmentada son 10^2 , 5×10^2 , 10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6 , 10^7 , 5×10^7 , 10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} , 5×10^{11} o 10^{12} pfu, y pueden administrarse a un sujeto una, dos, tres o más veces con intervalos tan a menudo como sea necesario. En otra realización, un arnavirus vivo se formula de tal manera que una dosis de 0,2 mL contiene $10^{6,5}$ - $10^{7,5}$ unidades focales fluorescentes de partícula de arnavirus vivo. En otra realización, una vacuna inactivada se formula de manera que contenga aproximadamente 15 µg a aproximadamente 100 µg, aproximadamente 15 µg a aproximadamente 75 µg, aproximadamente 15 µg a aproximadamente 50 µg, o aproximadamente 15 µg a aproximadamente 30 µg de un arnavirus.

En ciertas realizaciones, para la administración a niños, se administran a un niño dos dosis de una partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada descrita en la presente memoria o una composición de las mismas, administradas al menos con un mes de diferencia. En realizaciones específicas para la administración a adultos, se proporciona una dosis única de la partícula de arnavirus o partícula de arnavirus trisegmentada descritas en la presente memoria o una composición de las mismas. En otra realización, se administran a un adulto dos dosis de una partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada descrita en la presente memoria o una composición de las mismas, administrada al menos con un mes de diferencia. En otra realización, a un niño pequeño (de seis meses a nueve años) se le puede administrar una partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada descrita en la presente memoria o una composición de la misma por primera vez en dos dosis administradas con un mes de diferencia. En una realización particular, un niño que recibió solo una dosis en su primer año de vacunación debería recibir dos dosis en el año siguiente. En algunas realizaciones, se prefieren dos dosis administradas con 4 semanas de diferencia para niños de 2-8 años a los que se les administra por primera vez una composición inmunogénica descrita en la presente memoria. En ciertas realizaciones, para niños de 6-35 meses de edad, se puede preferir una media dosis (0,25 ml), en contraste con 0,5 ml que se puede preferir para sujetos mayores de tres años de edad.

En ciertas realizaciones, las composiciones pueden administrarse al paciente en una dosificación única que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de la partícula de arnavirus o de la partícula de arnavirus trisegmentada. En algunas realizaciones, la partícula de arnavirus o la partícula de arnavirus trisegmentada se puede administrar al paciente en una dosis única que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de una partícula de arnavirus o de una partícula de arnavirus trisegmentada y, una o más composiciones farmacéuticas, cada una en una cantidad terapéutica efectiva.

En ciertas realizaciones, la composición se administra al paciente como una dosis única seguida de una segunda dosis tres a seis semanas después. De acuerdo con estas realizaciones, las inoculaciones de refuerzo pueden administrarse a los sujetos a intervalos de seis a doce meses después de la segunda inoculación. En ciertas realizaciones, las inoculaciones de refuerzo pueden utilizar un arnavirus diferente o una composición del mismo. En algunas realizaciones, la administración de la misma composición que se describe en la presente memoria puede repetirse y separarse al menos 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 10 días, 15 días, 30 días, 45 días, 2 meses, 75 días, 3 meses o al menos 6 meses.

También se proporcionan en la presente memoria procesos y el uso de la partícula de arnavirus o la partícula de arnavirus trisegmentada para la fabricación de vacunas en la forma de preparaciones farmacéuticas, que comprenden la partícula de arnavirus o la partícula de arnavirus trisegmentada como ingrediente activo. Las composiciones farmacéuticas de la presente solicitud se preparan de una manera conocida per se, por ejemplo, por medio de procesos convencionales de mezclado y/o dispersión.

4.8 Ensayos

4.8.1 Ensayos de detección de arnavirus

El experto en la técnica podría detectar un segmento genómico de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada, como se describe en la presente memoria usando técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, se puede usar RT-PCR con cebadores que son específicos de un arnavirus para detectar y cuantificar un segmento genómico de arnavirus que ha sido preparado por ingeniería para portar un ORF en una posición distinta de la posición de tipo salvaje del ORF o una partícula de arnavirus trisegmentada. Se pueden usar la transferencia Western, ELISA, radioinmunoensayo, inmunoprecipitación, inmunocitoquímica o inmunocitoquímica junto con FACS para cuantificar los productos génicos del segmento genómico de arnavirus o partículas de arnavirus trisegmentadas.

4.8.2 Ensayo para medir la infectividad

Cualquier ensayo conocido por el experto en la técnica puede usarse para medir la infectividad de una preparación de vector de arnavirus. Por ejemplo, la determinación de la titulación de virus/vector puede realizarse mediante un

"ensayo de unidad formadora focos" (ensayo FFU). Brevemente, se siembran en placas células complementarias, p. ej., las células MC57 y se inoculan con diferentes diluciones de una muestra de virus/vector. Después de un período de incubación, para permitir que las células formen una monocapa y que el virus se una a las células, la monocapa se cubre con metilcelulosa. Cuando las placas se incuban más, las células infectadas originales liberan la progenie viral. Debido a la superposición de metilcelulosa, la propagación de los nuevos virus está restringida a las células vecinas. En consecuencia, cada partícula infecciosa produce una zona circular de células infectadas llamada Foco. Dichos focos pueden hacerse visibles y, por lo tanto, contables, utilizando anticuerpos frente a NP de LCMV u otra proteína expresada por la partícula de arenavirus o la partícula de arenavirus trisegmentada y una reacción de color basada en HRP. La titulación de un virus/vector se puede calcular en unidades formadoras de focos por mililitro (FFU/mL).

4.8.3 Crecimiento de una partícula de arenavirus

El crecimiento de una partícula de arenavirus descrita en la presente memoria puede evaluarse mediante cualquier método conocido en la técnica o descrito en la presente memoria (p. ej., cultivo celular). El crecimiento viral se puede determinar inoculando diluciones en serie de una partícula de arenavirus descrita en la presente memoria en cultivos celulares (p. ej., células Vero o células BHK-21). Después de la incubación del virus durante un tiempo específico, el virus se aísla utilizando métodos estándar.

4.8.4 ELISA de suero

La determinación de la respuesta inmune humoral tras la vacunación de animales (p. ej., ratones, cobayas) puede realizarse mediante ELISA de suero específico de antígeno (ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas). Brevemente, las placas se recubren con antígeno (p. ej., proteína recombinante), se bloquean para evitar la unión inespecífica de anticuerpos y se incuban con diluciones en serie de sueros. Después de la incubación, se pueden detectar los anticuerpos séricos unidos, p. ej., utilizando un anticuerpo específico antiespecie (p. ej., ratón, cobaya) acoplado a enzimas (que detecta las IgG totales o las subclases de IgG) y la posterior reacción de color. Las titulaciones de anticuerpos se pueden determinar, p. ej., como media geométrica de la titulación de punto final.

4.8.5 Ensayo para medir la actividad neutralizante de los anticuerpos inducidos

La determinación de los anticuerpos neutralizantes en suero se realiza con el siguiente ensayo celular usando células ARPE-19 de ATCC y un virus etiquetado con GFP. Además, se usa suero de cobaya suplementario como fuente de complemento exógeno. El ensayo se inicia con una siembra de 6.5×10^3 células/pocillo (50 μ l/pocillo) en una placa de 384 pocillos uno o dos días antes de su uso para la neutralización. La neutralización se realiza en placas de cultivo de tejidos estériles de 96 pocillos sin células durante 1 h a 37° C. Después de la etapa de incubación de neutralización, la mezcla se añade a las células y se incuba durante 4 días adicionales para la detección de GFP con un lector de placas. Se utiliza un suero humano neutralizante positivo como control positivo del ensayo en cada placa para verificar la fiabilidad de todos los resultados. Las titulaciones (CE50) se determinan utilizando un ajuste de curva logístico de 4 parámetros. Como ensayo adicional, los pocillos se controlan con un microscopio de fluorescencia.

4.8.6 Ensayo de reducción de placa

Brevemente, los ensayos de reducción de placa (neutralización) para LCMV se pueden realizar mediante el uso de un LCMV competente o deficiente para la replicación que está etiquetado con proteína fluorescente verde, se puede usar suero de conejo al 5 % como una fuente de complemento exógeno, y las placas pueden enumerarse por microscopía de fluorescencia. Las titulaciones de neutralización pueden definirse como la dilución más alta de suero que da lugar a una reducción del 50 %, 75 %, 90 % o 95 % en las placas, en comparación con las muestras de suero control (preinmunes).

Los genomas de ARN de LCMV de qPCR se aíslan utilizando el mini kit de ARN viral QIAamp (QIAGEN), de acuerdo con el protocolo proporcionado por el fabricante. Los equivalentes de genoma de ARN del LCMV se detectan mediante PCR cuantitativa realizada en un sistema de PCR en tiempo real StepOnePlus (Applied Biosystems) con el kit qRT-PCR SuperScript® III Platinum® One-Step (Invitrogen) y cebadores y sondas (informador FAM y apantallador NFQ-MGB) específicos para parte de la región de codificación de NP de LCMV u otra cadena genómica de la partícula de arenavirus o la partícula de arenavirus trisegmentada. El perfil de temperatura de la reacción puede ser: 30 minutos a 60° C, 2 minutos a 95° C, seguido de 45 ciclos de 15 segundos a 95° C, 30 segundos a 56° C. El ARN puede cuantificarse mediante la comparación de los resultados de la muestra con una curva estándar preparada a partir del log10 de una serie de diluciones de un fragmento de ARN transcrito in vitro cuantificado espectrofotométricamente, correspondiente a un fragmento de la secuencia de codificación de NP de LCMV u otra cadena genómica de la partícula de arenavirus o la partícula de arenavirus trisegmentada que los sitios de unión del contiene el cebador y de la sonda.

4.8.7 Transferencia Western

Las células infectadas que crecen en matraces de cultivo de tejidos o en suspensión se lisan en los puntos de tiempo indicados después de la infección usando tampón RIPA (Thermo Scientific) o se usan directamente sin lisis celular. Las muestras se calientan a 99° C durante 10 minutos con agente reductor y tampón de muestra NuPage LDS (NOVEX) y se enfrían hasta temperatura ambiente antes de cargarlas en geles SDS al 4-12 % para electroforesis. Las

proteínas se transfieren a membranas usando el dispositivo de transferencia de gel Invitrogens iBlot y se visualizan mediante tinción con Ponceau. Finalmente, las preparaciones se sondan con anticuerpos primarios dirigidos frente a proteínas de interés y anticuerpos secundarios conjugados con fosfatasa alcalina, seguidos de tinción con solución NBT/BCIP de 1 paso (INVITROGEN).

5 4.8.8 Ensayo de tinción de multímero de péptido MHC para la detección de la proliferación de células T CD8+ específicas de antígeno

10 Cualquier ensayo conocido por el experto en la técnica puede usarse para ensayar las respuestas de células T CD8+ específicas de antígeno. Por ejemplo, se puede usar el ensayo de tinción de tetrámero de péptido MHC (véase, p. ej., Altman J.D. *et al.*, *Science*. 1996; 274: 94-96; y Murali-Krishna K. *et al.*, *Immunity*. 1998; 8: 177-187). Brevemente, el ensayo comprende los siguientes pasos, se usa un ensayo de tetrámero para detectar la presencia de células T específicas de antígeno. Para que una célula T detecte el péptido frente al que es específica, debe reconocer tanto el péptido como el tetrámero de las moléculas de MHC hechas a medida para una especificidad de antígeno definida y el haplotipo MHC de las células T (típicamente marcadas con fluorescencia). El tetrámero se detecta entonces por citometría de flujo a través del marcaje fluorescente.

15 4.8.9 Ensayo ELISPOT para la detección de la proliferación de células T CD4+ específicas de antígeno.

20 Cualquier ensayo conocido por el experto en la técnica puede usarse para ensayar las respuestas de células T CD4+ específicas de antígeno. Por ejemplo, se puede usar el ensayo ELISPOT (véase, p. ej., Czerkinsky C.C. *et al.*, *J Immunol Methods*. 1983; 65: 109-121; y Hutchings P.R. *et al.*, *J Immunol Methods*. 1989; 120: 1-8). Brevemente, el ensayo comprende los siguientes pasos: se recubre una placa de inmunospot con un anticuerpo anticitoquina. Las células se incuban en la placa de inmunospot. Las células secretan citoquinas y luego se lavan. Luego, las placas se recubren con un segundo anticuerpo biotinilado-anticitoquina y se visualizan con un sistema avidina-HRP.

4.8.10 Ensayo de citoquinas intracelulares para la detección de la funcionalidad de las respuestas de las células T CD8+ y CD4+.

25 Cualquier ensayo conocido por el experto en la técnica puede usarse para ensayar la funcionalidad de las respuestas de las células T CD8+ y CD4+. Por ejemplo, se puede usar el ensayo de citoquinas intracelulares combinado con citometría de flujo (véase, p. ej., Suni M.A. *et al.*, *J Immunol Methods*. 1998; 212: 89-98; Nomura L.E. *et al.*, *Cytometry*. 2000; 40: 60-68; y Ghanekar S.A. *et al.*, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 2001; 8: 628-63). Brevemente, el ensayo comprende los siguientes pasos: activación de células a través de péptidos o proteínas específicos, se añade una inhibición del transporte de proteínas (p. ej., brefeldina A) para retener las citoquinas dentro de la célula. Después de un período definido de incubación, típicamente 5 horas, sigue una etapa de lavado y se pueden añadir a las células anticuerpos frente a otros marcadores celulares. Las células se fijan y se permeabilizan. Se añaden los anticuerpos anticitoquinas conjugados con fluorocromo y las células pueden analizarse mediante citometría de flujo.

4.8.11 Ensayo para confirmar la deficiencia para la replicación de vectores virales

35 Cualquier ensayo conocido por el experto en la materia que determine la concentración de partículas virales infecciosas y competentes para la replicación también se puede usar para medir las partículas virales deficientes para la replicación en una muestra. Por ejemplo, los ensayos de FFU con células no complementarias pueden usarse para este propósito.

40 Además, los ensayos basados en placa son el método estándar utilizado para determinar la concentración de virus en términos de unidades formadoras de placa (PFU) en una muestra de virus. Específicamente, una monocapa confluyente de células huésped no complementarias se infecta con el virus a diferentes diluciones y se cubre con un medio semisólido, tal como el agar, para evitar que la infección del virus se propague indiscriminadamente. Una placa viral se forma cuando un virus se infecta con éxito y se replica en una célula dentro de la monocapa celular fijada, y se disemina en las células circundantes (véase, p. ej., Kaufmann, S.H.; Kabelitz, D. (2002). *Methods in Microbiology* Vol.32: *Immunology of Infection*. Academic Press ISBN 0-12-521532-0). La formación de placas puede tardar 2-14 días, dependiendo del virus que se esté analizando. Las placas generalmente se cuentan manualmente y los resultados, en combinación con el factor de dilución utilizado para preparar la placa, se utilizan para calcular el número de unidades formadoras de placa por volumen de unidad de muestra (PFU/mL). El resultado de PFU/mL representa el número de partículas infectivas competentes para la replicación dentro de la muestra. Cuando se usan células C, se puede usar el mismo ensayo para titular las partículas de arnavirus o partículas de arnavirus trisegmentadas deficientes para la replicación.

4.8.12 Ensayo para la expresión del antígeno viral

Cualquier ensayo conocido por el experto en la técnica puede usarse para medir la expresión de antígenos virales. Por ejemplo, se pueden realizar ensayos de FFU. Para la detección, se usan preparaciones de anticuerpos mono o policlonales frente a los respectivos antígenos virales (FFU específico de transgén).

55 4.8.13 Modelos animales

Para investigar la recombinación y la infectividad de una partícula de arnavirus descrita en la presente memoria, se pueden usar modelos animales *en vivo*. En ciertas realizaciones, los modelos animales que pueden usarse para investigar la recombinación y la infectividad de una partícula de arnavirus trisegmentada incluyen ratón, cobaya, conejo y monos. En una realización preferida, los modelos animales que pueden usarse para investigar la recombinación y la infectividad de un arnavirus incluyen ratón. En una realización más específica, los ratones que pueden usarse para investigar la recombinación y la infectividad de una partícula de arnavirus son triplemente deficientes para el receptor de interferón tipo I, el receptor de interferón tipo II y el gen activador de recombinación 1 (RAG1).

En ciertas realizaciones, los modelos animales pueden usarse para determinar la infectividad del arnavirus y la estabilidad transgénica. En algunas realizaciones, el ARN viral puede aislarse del suero del modelo animal. Los expertos en la materia conocen fácilmente las técnicas. El ARN viral se puede transcribir inversamente y el ADNc que porta los ORF de arnavirus se puede amplificar por PCR con cebadores específicos de gen. La citometría de flujo también se puede usar para investigar la infectividad del arnavirus y la estabilidad transgénica.

5. EJEMPLOS

Estos ejemplos demuestran que la tecnología de vectores basada en virus LCMV puede usarse para desarrollar con éxito (1) un segmento genómico de arnavirus con un ORF viral en una posición distinta de la posición de tipo salvaje del ORF, y (2) una partícula de arnavirus trisegmentada que no da como resultado una partícula viral bisegmentada competente para la replicación.

5.1 Materiales y métodos

5.1.1 Células

Las células BHK-21 se cultivaron en medio Eagle de Dulbecco con alto contenido de glucosa (DMEM; Sigma) suplementado con suero de ternera fetal inactivado por calor al 10 % (FCS; Biochrom), HEPES 10 mM (Gibco), piruvato sódico 1 mM (Gibco) y 1x caldo de fosfato de triptosa. Las células MC57 se mantuvieron en Medio Esencial Mínimo (MEM; Sigma) complementado con FCS inactivado por calor al 5 %, L-glutamina 2 mM (Gibco) y penicilina-estreptomicina (100.000 U/ml de penicilina y 50 mg/l de estreptomina; Gibco). Ambas líneas celulares se cultivaron a 37 °C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5 %.

Las células BHK-21 que expresan NP se generaron transfectando células BHK-21 con un plásmido que expresa NP bajo el control del promotor eucariota EF1-alfa y que codifica el gen de resistencia a la puomicina de acuerdo con el protocolo del fabricante. 48 horas después de la transfección, se añadieron 4 µg/ml de puomicina al medio. Otras 48 horas después, las células se subcultivaron en matraces T150. Una vez que los clones separados se hicieron visibles, las células se recogieron y se diluyeron de forma seriada en una placa de 96 pocillos para obtener clones individuales. Los pocillos se verificaron ópticamente para el crecimiento de poblaciones celulares a partir de clones individuales y las células respectivas se subcultivaron en placas de 6 pocillos una vez que formaron una monocapa confluyente. Las células BHK-21 que expresan NP se cultivaron en medio BHK-21 en presencia de 4 µg/ml de puomicina.

Las células BHK-21 que expresan GP se han descrito previamente. Brevemente, las células BHK-21 se transfectoron de manera estable con un plásmido que expresa un ADNc de GP de LCMV con optimización de codones y el casete de resistencia a la puomicina. Los clones que expresan GP se seleccionaron mediante la adición de 4 µg/ml de puomicina al medio y los clones individuales se obtuvieron mediante diluciones seriadas como se describe para las células BHK-21 que expresan NP.

5.1.2 Plásmidos

Los plásmidos pol-I L, pC-NP y pC-L se han descrito previamente. Para la generación de plásmidos pol-I S que codifican GFP o RFP como genes informadores y NP o GP, utilizamos un plásmido de clonación pol-I Bbs/Bsm como base (pol-I 5'-BsmBI_IGR_BbsI_3'). Este plásmido codifica para la región no traducida en 5' (5' UTR) del segmento S viral seguido de dos sitios de restricción BsmBI, la región intergénica (IGR), un NP de descanso y el marco de lectura abierto CAT (ORF) flanqueado por sitios de restricción BbsI y la 3' UTR del segmento S. Los plásmidos pol-I S que codifican GP en su orientación 5' natural y GFP en orientación antisentido en la posición 3' (pol-I 5'-GP_IGR_GfP-3') se clonaron insertando GP mediante restricción específica de sitio de BsmBI y ligación en el plásmido pol-I Bbs/Bsm. En un segundo paso, se insertó GFP por digestión con BbsI y ligación. Para obtener plásmidos pol-I S que codifican GP en la orientación artificial 3' (pol-I 5'-GFP_IGR_GP-3'), GP se insertó mediante digestión con BbsI en la posición 3' en el plásmido pol-I Bbs/Bsm y GFP con restricción con BsmBI/ligación en la posición 5'. El pol-I S que codifica GFP o RFP y NP (pol-I 5'-GFP_IGR_NP-3' o pol-I 5'-RFP_IGR_NP-3') se clonaron insertando NP por digestión con BbsI y ligación en el plásmido de clonación pol-I Bbs/Bsm y GFP o RFP por clonación con BsmBI. El plásmido pol-I con GP de la cepa de LCMV WE y NP de la cepa de LCMV Clon 13 (Cl13) se clonaron insertando los genes respectivos mediante restricción específica de sitio con Bbs y Bsm/ligación en los sitios respectivos en el plásmido de clonación pol-I Bbs/Bsm.

El segmento S que codifica el GP de fusión WE/WET se obtuvo reemplazando los últimos 255 pares de bases del ORF de WE con una secuencia optimizada por codones llamada "WET". Esto se logró amplificando por PCR en un

primer paso un fragmento de GP de WE con un cebador específico de WE (SEQ ID NO: 11) y un cebador de fusión específico de WE que portaba un saliente complementario a la secuencia de WET (SEQ ID NO: 12). Paralelamente, la secuencia de WET se amplificó por PCR usando un cebador específico de WET (SEQ ID NO: 13) y un cebador de fusión específico de WET complementario a la secuencia de WE (SEQ ID NO: 14). En una tercera reacción de PCR, los dos productos de PCR se fusionaron mediante fusión por PCR usando los dos cebadores de fusión mencionados. El fragmento de fusión WE/WET resultante se digirió con BsmBI y se ligó en un plásmido pol-I BsmBI_IGR_GFP-3' que se había digerido con la misma enzima de restricción.

El plásmido pol-I que codifica el segmento S recombinado del virus recombinado in vivo r3LCMV-GFP^{nat} #3 se clonó insertando el fragmento de ADN sintetizado (síntesis génica por GenScript) mediante restricción/ligación específica del sitio con SacI y XmaI en un plásmido que codifica un segmento S de tipo salvaje bajo el control de un promotor pol-I (pol-I GP_IGR_NP) dando lugar a pol-I GP_IGR_GFPrest_IGR_NP.

5.1.3 Transfección de ADN de células y rescate de virus recombinantes.

Las células BHK-21 se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 4x10⁵ células/pocillo y se transfectaron 24 horas después con diferentes cantidades de ADN utilizando lipofectamina (3 µl/µg de ADN; Invitrogen) o jetPRIME (2 µl/µg de ADN; Polyplus) según las instrucciones del fabricante. Para el rescate de virus bisegmentados recombinantes completamente a partir del ADN plasmídico, los dos factores que actúan en trans mínimos virales NP y L se administraron a partir de plásmidos dirigidos por pol-II (0,8 µg de pC-NP, 1 µg de pC-L) y se cotransfectaron con 1,4 µg de pol-I L y 0,8 µg de pol-I S. En el caso del rescate de r3LCMV trisegmentado que consiste en un segmento L y dos segmentos S, se incluyeron 0,8 µg de ambos segmentos S dirigidos por pol-I en la mezcla de transfección. 72 horas después de la transfección, el sobrenadante se recogió y se pasó sobre células BHK-21 para una mayor amplificación del virus. Las titulaciones virales en el sobrenadante se determinaron por ensayo de formación de focos.

5.1.4 Virus y cinética de crecimiento de los virus.

El CI13 LCMV de tipo salvaje, originalmente derivado del LCMV de tipo salvaje Armstrong, se ha descrito previamente. Se produjeron preparaciones madre de virus de tipo salvaje y recombinante infectando células BHK-21 a una multiplicidad de infección (moi) de 0,01 y el sobrenadante se recogió 48 horas después de la infección. Las curvas de crecimiento de los virus se realizaron in vitro en un formato de 6 pocillos. Las células BHK-21 se sembraron a una densidad de 6 x 10⁵ células/pocillo y se infectaron 24 horas después incubando las células junto con 500 µl del inóculo del virus a una moi de 0,01 durante 90 minutos en una placa basculante a 37 °C y 5 % de CO₂. Se añadió medio nuevo y las células se incubaron a 37 °C/5 % de CO₂ durante 72 a 96 horas. El sobrenadante se tomó en puntos de tiempo dados (normalmente 18, 24, 48, 72 horas) y las titulaciones virales se analizaron mediante un ensayo de formación de focos.

5.1.5 Ensayo de formación de focos

A continuación, las titulaciones de LCMV se determinan por el ensayo de formación de focos. El LCMV es un virus no citolítico que no lisa sus células huésped y, como tal, no crea placas. Sin embargo, las unidades en este trabajo se expresarán en el término unidades de formación de placa (PFU) más comúnmente utilizado en lugar del término correcto de unidades de formación de focos (FFU). Las células MC57 se usaron para el ensayo de formación de focos si no se indica lo contrario. Las células se sembraron a una densidad de 1,6x10⁵ células por pocillo en una placa de 24 pocillos y se mezclaron con 200 µl de diluciones seriadas de 10 veces de virus preparadas en MEM/FCS al 2 %. Después de 2-4 horas de incubación a 37 °C, se añadieron 200 µl de un medio viscoso (metilcelulosa al 2 % en 2x DMEM suplementado) por pocillo para asegurar la propagación de las partículas virales solo a las células vecinas. Después de 48 horas a 37 °C, el sobrenadante se retiró y las células se fijaron añadiendo 200 µl de paraformaldehído al 4 % (PFA) en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente (todos los pasos siguientes se realizan a temperatura ambiente). Las células se permeabilizaron con 200 µl por pocillo de BSS/Triton X-100 al 1 % (Merck Millipore) durante 20 minutos y posteriormente se bloquearon durante 60 minutos con PBS/FCS al 5 %. Para la tinción anti-NP se usó un anticuerpo monoclonal anti-LCMV-NP de rata como anticuerpo de tinción primario a una dilución de 1:30 en PBS/FCS al 2,5 % durante 60 minutos. Para la tinción anti-GFP, se usó anticuerpo de rata anti-GFP purificado (Biolegend 338002) a una dilución de 1:2.000 en PBS/FCS al 2,5 %. Las placas se lavaron tres veces con agua del grifo y se añadió la IgG secundaria anti-IgG de rata de cabra conjugada con HRP a una dilución de 1:100 en PBS/FCS al 2,5 % y se incubó durante 1 hora. La placa se lavó nuevamente tres veces con agua del grifo. Se añadió la reacción de color (0,5 g/l de DAB (Sigma D-5637), 0,5 g/l de sulfato de níquel de amonio en PBS/H₂O₂ al 0,015 %) y la reacción se detuvo después de 10 minutos con agua del grifo. Los focos teñidos se contaron manualmente y la titulación final se calculó de acuerdo con la dilución.

Para la tinción anti-GP de las células, las placas se fijaron con MeOH al 50 %/Acetona al 50 % durante 5 minutos y se lavaron con PBS. El bloqueo se realizó como se describe. Como anticuerpo primario, el GP83.4 anti-GP (producido a partir de hibridomas) se diluyó 1:10 en PBS/FCS al 2,5 % y se incubó durante 60 minutos. Después de tres lavados con agua del grifo, se añadió el anticuerpo IgG secundario anti-ratón de conejo conjugado con HRP a una dilución de 1:50 en PBS/FCS al 2,5 % y se incubó durante 60 minutos. Después de otros tres lavados con agua del grifo, se añadió la reacción de color como se describió anteriormente.

Para determinar la viremia de los ratones en sangre, se recogió una gota de sangre (correspondiente a un volumen de 50 μ l) en 950 μ l de heparina BSS (heparina Na, Braun, 1 IE/ml final), se mezcló por inversión y se almacenó a -80 °C hasta su uso posterior.

5.1.6 Ratones

5 Los ratones AGRAG (IFN α / β R $^{-/-}$, IFN γ R $^{-/-}$, RAG $^{-/-}$) se han descrito previamente y fueron criados y estabulados en condiciones específicas libres de patógenos (SPF). Fueron criados en el Institut für Labortierkunde de la Universidad de Zúrich, Suiza. Todos los experimentos con animales se realizaron en las Universidades de Ginebra y Basilea de acuerdo con la ley suiza para la protección de los animales y el permiso de las autoridades cantonales responsables respectivas de Ginebra y Basilea. La infección de los ratones se realizó por vía intravenosa a una dosis de 1×10^4 PFU por ratón.

5.1.7 Preparación de ARN viral y secuenciación

15 El ARN viral se extrajo del sobrenadante del cultivo celular o del suero de ratones infectados utilizando el Mini Kit de ARN viral QIAamp (QIAGEN) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La reacción de transcripción inversa se realizó con el sistema de RT-PCR ThermoScript (Invitrogen) y un cebador específico para NP de LCMV (SEQ ID NO: 15) siguiendo el protocolo del fabricante. La amplificación por PCR se realizó mediante el uso de 2 μ l del ADNc de la etapa RT y cebadores específicos de NP y GP (SEQ ID NO: 16). La reacción de PCR se realizó usando ADN polimerasa Phusion High-Fidelity (NEB). Los productos amplificados se analizaron y se escindieron de un gel de agarosa al 2 %, se purificaron usando el kit de extracción de gel QIAquick (QIAGEN) y se enviaron para la secuenciación de ADN de Sanger (Microsynth) usando los cebadores específicos de NP y GP.

20 5.1.8 Citometría de flujo

La sangre se tiñó con anticuerpos frente a CD11c (N418), CD11b (M1/70), CD19 (6D5), NK1.1 (PK136), CD90.2 (30-H12) y GR-1 (RB6-8C5). La expresión de moléculas de superficie teñidas con anticuerpos específicos, así como la expresión de GFP y RFP, se analizó en un citómetro de flujo BD LSR Fortessa usando el software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR).

25 5.1.9 Análisis estadístico

La significancia estadística se determinó mediante el ensayo de la t no emparejada de dos colas o el ANOVA de 1 vía seguido de la prueba posterior de Dunnett o Bonferroni para comparaciones múltiples utilizando el software Graphpad Prism (versión 6.0d). los valores de p de $p > 0,5$ se consideraron no significativos (ns), mientras que los valores de p de $p < 0,5$ se consideraron significativos (*) con gradaciones de $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ (***) siendo altamente significativas.

5.2 Resultados

5.2.1 Los virus trisegmentados recombinantes crecen a titulaciones más bajas que el LCMV de tipo salvaje

35 El genoma del LCMV de tipo salvaje consiste en dos segmentos de ARN monocatenario de polaridad negativa (un segmento L, uno S) (Fig. 1A). En los últimos años, se ha mostrado que es posible introducir genes extraños adicionales en el genoma normalmente bisegmentado que se encuentra en las partículas de LCMV. Los genes NP y GP se segregan en dos análogos del segmento S, y los genes de interés se insertan en cada segmento S resultante de LCMV, lo que da como resultado partículas virales competentes para la replicación con tres segmentos de ARN (dos S + uno L). La única estrategia publicada actualmente mantiene tanto NP como GP en su posición natural en el segmento S, colocando así a GFP u otros transgenes en los respectivos sitios libres (r3LCMV-GFP^{nat}) (Fig. 1B). Esta fue la estrategia intuitiva destinada a minimizar el riesgo probable de que la reorganización genética del segmento S anule la viabilidad del genoma resultante. Sin embargo, este estudio planteó la hipótesis de que también debería ser posible yuxtaponer la GP al 3'UTR, expresándolo desde el elemento promotor que normalmente dirige la NP (r3LCMV-GFP^{art}; Fig. 1C). Los plásmidos de expresión respectivos se generaron mediante clonación de ADNc recombinante y las tres construcciones virales se rescataron completamente a partir del ADN plasmídico. Se realizaron curvas de crecimiento comparativas con los tres virus (Fig. 1D). Los tres virus mostraron las titulaciones más altas 48 horas después de la infección, con titulaciones máximas de virus trisegmentados 10-100 veces más bajas que el virus de tipo salvaje. El LCMV de tipo salvaje alcanzó $3,4 \times 10^6$ PFU/ml, r3LCMV-GFP^{nat} alcanzó su punto máximo a $2,7 \times 10^4$ PFU/ml y r3LCMV-GFP^{art} a $2,2 \times 10^5$ PFU/ml. Independientemente de sus titulaciones máximas reducidas de forma similar, r3LCMV-GFP^{nat} exhibió una infectividad libre de células algo mayor durante los puntos de tiempo tempranos que r3LCMV-GFP^{art}.

5.2.2 El empaquetamiento de partículas virales segmentadas es menos eficiente que el del virus bisegmentado

55 Estas observaciones sugirieron que la adición de un segundo segmento S alteraba y retrasaba el crecimiento viral. Se planteó la hipótesis de que esta reducción en la aptitud viral podría deberse al empaquetamiento ineficiente de los tres segmentos de ARN en partículas virales, y que se formaba un exceso de partículas bisegmentadas, que no se replicaron productivamente al infectar células frescas. Para estos experimentos, se usaron r3LCMV con dos genes

informadores diferentes, es decir, GFP junto con GP en un segmento S, y NP cerca de RFP en el segundo segmento S. Esto dio lugar a dos virus llamados r3LCMV-GFP/RFP^{nat} y r3LCMV-GFP/RFP^{art}, que solo difieren en la organización de GFP y GP en el segmento S respectivo. Las células BHK-21 se infectaron con r3LCMV-GFP-RFP^{nat} o r2LCMV bisegmentado y se realizaron ensayos de formación de focos en células BHK-21 normales o, en paralelo, con células BHK-21 transfectadas de forma estable que expresan bien GP (BHK-GP) o NP (BHK-NP) como sustrato celular para transcomplementar los genomas virales que carecen de los genes respectivos. Las células de tipo salvaje y complementarias para GP se tiñeron para focos virales que expresan nucleoproteína, mientras que las células complementarias para NP se tiñeron para focos positivos para GP. De este modo, la formación de inmunofocos en células BHK-21 de tipo salvaje detectó solo viriones trisegmentados. Sin estar limitados por la teoría, las células BHK-GP deberían replicar viriones trisegmentados, así como los bisegmentados que contienen el segmento L en combinación con el segmento S que expresa NP (pero sin el S que expresa GP). Por el contrario, las células BHK-NP deberían replicar LCMV trisegmentado y adicionalmente viriones deficientes para NP que consisten en el segmento L y S que expresa GP (pero que carecen del segmento S que expresa NP). Las titulaciones infecciosas de ambos r3LCMV-GFP/RFP^{nat} y r3LCMV-GFP/RFP^{art}, fueron consistentemente más altas cuando se evaluaron en células BHK-GP o BHK-NP que cuando se evaluó la infectividad en células BHK-21 de tipo salvaje. Por el contrario, las titulaciones de r2LCMV fueron similares, independientemente del sustrato celular utilizado para evaluar su infectividad. Con el fin de corregir las posibles diferencias intrínsecas en la permisividad de cada línea celular al LCMV, la titulación de cada virus en las células BHK-21 se normalizó a uno, para la visualización y las titulaciones de BHK-GP, así como de BHK-NP se expresaron como un múltiplo de los mismos. Por lo tanto, se reflejan las diferencias en las titulaciones relacionadas con los clones de células respecto a las posibles diferencias intrínsecas en los clones en la permisividad viral (Fig. 2A). En cualquiera de las células complementarias, se observó una diferencia en la titulación de aproximadamente cinco a diez veces para r3LCMV-GFP/RFP^{nat} y r3LCMV-GFP/RFP^{art}, que fue significativamente mayor que para r2LCMV. Esto sugirió que una mayoría de las partículas virales, que estaban formadas por los dos virus trisegmentados, contenían solo uno de los dos segmentos S, que codificaba solo el segmento S que expresa NP (partículas solo NP) o que expresa GP (partículas solo GP), respectivamente. La diferencia de 5 veces o más en la titulación sugirió que tanto las partículas solo NP como las solo GP superaron en número a las partículas trisegmentadas aproximadamente cinco veces cada una, y que las partículas trisegmentadas constituían menos del 10 por ciento de los viriones solamente, lo que era compatible con un retraso en el crecimiento y una reducción en las titulaciones máximas virales cuando se cultivaba en células no complementarias (Fig. 1D). Estos hallazgos fueron validados además por citometría de flujo. Las células BHK-21 no complementarias o las células BHK-NP se infectaron con r3LCMV-GFP/RFP^{art} o r2LCMV como control de activación y las intensidades de fluorescencia de GFP y RFP se evaluaron con un citómetro de flujo (Fig. 2B). Dado que las células BHK-21 de tipo salvaje no proporcionan los factores que actúan en trans mínimos, solo los viriones que contienen al menos un segmento L junto con el segmento S que expresa NP pueden iniciar un ciclo infeccioso después de la entrada en la célula, dando lugar a una señal de fluorescencia (RFP). De acuerdo con esto, se observó una población de células RFP+GFP- tras la infección de las células BHK-21, lo que refleja partículas solo NP. Las células doble positivas RFP+GFP+ fueron la evidencia de partículas trisegmentadas genuinas. De acuerdo con la selección, también se observaron células RFP-GFP+, pero tenían una MFI de RFP más alta que las células RFP-GFP-, lo que sugiere que representaban estadios tempranos de infección por partículas trisegmentadas, una interpretación que también está respaldada por la continuidad de esta población y la doble positiva RFP+GFP+. Sin embargo, cuando se cultiva r3LCMV-GFP/RFP^{art} trisegmentado en células BHK-NP, sustituyendo así este factor que actúa en trans mínimo, observamos un número de células RFP-GFP+ más de 10 veces mayor en comparación con la infección de células BHK-21 no complementarias. Por el contrario, se detectaron células RFP+ GFP- (evidencia de partículas solo NP) y células doble positivas GFP+RFP+ (partículas trisegmentadas) en abundancia comparable (Fig. 2C). Estos resultados confirmaron a nivel de célula individual los hallazgos obtenidos mediante el ensayo de formación de focos, corroborando así que las preparaciones de virus trisegmentadas contienen una mayoría de partículas bisegmentadas deficientes para la replicación. Estos hallazgos ofrecieron una explicación probable para el crecimiento atenuado de r3LCMV-GFP/RFP^{nat} y r3LCMV-GFP/RFP^{art} proporcionando información sobre un empaquetamiento aleatorio aparentemente bastante ineficiente de los virus trisegmentados.

5.2.3 Clonación y rescate de virus recombinantes para rastrear la recombinación *in vivo*

Dado que los virus trisegmentados muestran una cinética de crecimiento alterada como se ve en la Fig. 1, se planteó la hipótesis de que debería haber una alta presión de selección en los virus para recombinar su información genética para NP y GP en un solo segmento S. Se postula que la recombinación entre segmentos de arnavirus condujo a la evolución filogenética del grupo norteamericano, y por lo tanto parecía un mecanismo potencial por el cual los virus trisegmentados podrían restablecer un genoma bisegmentado funcional. Sin estar limitado por la teoría, al observar la organización genómica de los dos virus trisegmentados, se postuló que la presión de selección sobre r3LCMV-GFP^{nat} podría favorecer los eventos de recombinación en el área de la IGR, para unir GP y NP en el mismo segmento, mientras se elimina la GFP. En la población de r3LCMV-GFP^{art} la presión de selección debería ser igualmente alta, sin embargo, la reorganización de GP y su posicionamiento cerca de la 3'UTR debería hacer que sea muy difícil, si no imposible, que este virus combine sus dos segmentos S en un segmento funcional (véase la Fig. 7 a continuación). Debido a las advertencias para la identificación de la recombinación de ARN y para discriminarla firmemente de la potencial contaminación con ADNc, clonamos un segmento S que portaba GFP junto con un ORF de GP recombinante en donde los 255 nucleótidos terminales estaban optimizados por codones. La GP resultante tenía una secuencia de nucleótidos diferente pero un producto de traducción idéntico a la GP de la cepa WE de tipo salvaje (WE/WET-GP,

Fig. 3A). Sin embargo, este ORF de WE/WET GP recombinante no existía como un virus bisegmentado infeccioso ni el laboratorio poseía una construcción de ADNc en donde estaba asociado con NP. Por lo tanto, cualquier virus bisegmentado potencial que contenga WE/WET en el mismo segmento que NP se consideró una clara evidencia de recombinación entre segmentos, diferenciando dichos virus de ADNc o ARN potencialmente contaminantes en los ensayos respectivos. Para ensayar si la GP quimérica tenía un efecto sobre la aptitud viral, se realizaron curvas de crecimiento del cultivo celular del virus trisegmentado recombinante que porta la GP de fusión WE/WET (r3LCMV-WEWET/GFP^{nat}) en comparación con un virus trisegmentado que portaba la GP de WE de tipo salvaje (r3LCMV-WE/GFP^{nat}) (Fig. 3B). La cinética de crecimiento y las titulaciones máximas de los dos virus fueron comparables (r3LCMV-WE/GFP^{nat}: $1,7 \times 10^6$ PFU/ml, r3LCMV-WEWET/GFP^{nat}: $2,3 \times 10^6$ PFU/ml). Por lo tanto, la glucoproteína WEWET quimérica no tuvo un impacto detectable en el crecimiento viral.

Para ensayar si los potenciales eventos de recombinación podrían ocurrir entre los genes NP y GP del segmento S que involucrarían a la IGR. Por lo tanto, se introdujo una delección de un único nucleótido en la región intergénica del segmento S que codifica NP, para servir como una etiqueta genética. La elección de esta delección de nucleótido se realizó porque está situada en una cadena que, a diferencia de la mayoría de las IGR del segmento S, no se conserva entre cepas, ni en secuencia ni en longitud. En el caso de un evento de recombinación, esta región intergénica "etiquetada" (marcada como * en todo, tanto en las figuras como en el texto) debería permitir la identificación del origen genético de las secuencias de IGR del segmento S. La Figura 3C muestra la posición de la citosina delecionada (marcada con una flecha) y un esquema del segmento S que porta NP resultante. Para ensayar si la delección introducida en la IGR tenía un impacto en el crecimiento viral, se rescató r3LCMV-GFP^{nat} recombinante con o sin la delección de un único nucleótido. Se realizaron experimentos de curva de crecimiento en células BHK-21 (moi = 0,01). Un virus trisegmentado con una IGR de tipo salvaje (r3LCMV-GFP^{nat}) y su comparador con la IGR mutada (r3LCMV-GFP^{nat} IGR*) creció a un ritmo similar y alcanzó titulaciones máximas indistinguibles (Figura 3D). En consecuencia, la etiqueta de la IGR en el segmento S portador de NP no tuvo un impacto detectable en la aptitud viral, validando así su uso para la experimentación posterior *in vivo*.

5.2.4 La infección persistente en ratones con r3LCMV-GFP^{nat} pero no r3LCMV-GFP^{art} alcanza niveles de viremia equivalentes al virus bisegmentado de tipo salvaje y da como resultado la pérdida de la expresión de GFP

Tras el rescate del r3LCMV-GFP^{nat} recombinante, un objetivo fue investigar si los virus trisegmentados se recombinaban *in vivo*. Para este propósito, los ratones AGRAG se infectaron con r3LCMV-GFP^{nat}, r3LCMV-GFP^{art} o un r2LCMV bisegmentado como control. Los ratones AGRAG portan delecciones dirigidas en los genes que codifican el receptor de interferón α/β , el receptor de interferón γ y RAG1, lo que conduce a un fenotipo inmunodeficiente y al establecimiento de viremia crónica después de la infección con LCMV trisegmentado. Se tomaron muestras de sangre con el tiempo y las titulaciones virales se evaluaron mediante un ensayo de formación de focos (Fig. 4A). Los portadores de LCMV bisegmentados mostraron viremia de alto titulación en el rango de 5×10^5 PFU/ml de sangre en los 5 días posteriores a la infección, con viremia estable posteriormente en el rango de 10^4 - 10^5 de PFU/ml hasta al menos el día 50 después de la infección. Los ratones infectados con LCMV trisegmentado mostraron cargas virales de aproximadamente 5×10^3 PFU/ml de sangre hasta el día 20, en línea con el crecimiento atenuado en cultivo celular (en comparación con la Fig. 1D). Desde el día 30 en adelante, los portadores de r3LCMV-GFP^{nat} mostraron un aumento en las cargas virales, lo que no se observó en animales infectados con r3LCMV-GFP^{art}, lo que resulta en una diferencia de más de 10 veces en la viremia en el día 50. Para determinar si la población de virus dominante todavía portaba el gen informador de GFP, lo que resultaba así en la expresión de GFP en las células infectadas, se realizaron ensayos de formación de focos virales con muestras de sangre de portadores de r3LCMV-GFP^{nat} y r3LCMV-GFP^{art} tomadas el día 127 después de la infección y se tiñeron para la nucleoproteína o el gen informador GFP (Fig. 4B). Mientras que la tinción de sangre aislada de portadores de r3LCMV-GFP^{art} dio como resultado cantidades iguales de focos con detección de anticuerpos anti-NP y anti-GFP (ambas evaluaciones indican independientemente titulaciones virales en el rango de 10^3 PFU/ml), fueron evidentes números al menos 100 veces más altos de focos totales (NP+) r3LCMV-GFP^{nat} que los focos que expresan GFP. Las titulaciones virales de al menos 10^4 PFU/ml se midieron en base a la detección anti-NP, mientras que dos de cada tres ratones no mostraron ninguna infectividad positiva para GFP detectable y un ratón tenía una fracción residual de focos positivos para GFP en el rango de 100 PFU/ml, correspondiente al límite inferior de detección de nuestros ensayos. La expresión de GFP de células infectadas también se evaluó mediante microscopía de fluorescencia (datos no mostrados). Los focos fluorescentes de GFP eran prácticamente indetectables cuando se analizaba sangre de portadores de r3LCMV-GFP^{nat}, mientras que los recuentos manuales de focos positivos para GFP de sangre de portadores de r3LCMV-GFP^{art} concordaron con los resultados de las titulaciones obtenidos con el ensayo de formación de focos anti-NP. La expresión del gen informador se verificó adicionalmente mediante análisis de citometría de flujo de PBMC de ratones infectados en el día 120 después de la infección. Encontramos que más del 10 % de los monocitos/macrófagos CD11b+GR1- fueron positivos para GFP en animales infectados con r3LCMV-GFP^{art} mientras que la sangre de r3LCMV-GFP^{nat} evidenció solo niveles de fondo de GFP, que fue comparable a los animales infectados con r2LCMV no fluorescente (Fig. 4C-E). Este hallazgo apoyó aún más la hipótesis de que los virus trisegmentados con GP en su posición natural pierden la expresión del gen informador con el tiempo, mientras que la transposición de la GP en la yuxtaposición artificial 3'UTR previno la pérdida del transgén.

5.2.5 Los virus trisegmentados con GP en la posición natural pueden recombinar sus dos segmentos S dando lugar a un solo segmento S con duplicaciones de IGR parciales o completas que flanquean un rudimento de secuencia transgénica

La Figura 4 mostró viremia elevada y pérdida de la expresión del gen informador en ratones infectados con r3LCMV-GFP^{nat}. Por lo tanto, se planteó la hipótesis de que un evento de recombinación podría explicar este resultado experimental. La recombinación entre segmentos debe combinar GP y NP en el mismo segmento S, evitando la necesidad de un segundo segmento S en el ciclo de replicación viral. Tal evento podría haber explicado la viremia a nivel del virus de tipo salvaje, en combinación con la pérdida de la expresión del gen informador. Para ensayar esta posibilidad, se aisló el ARN viral del suero de ratones infectados y se usó un par de cebadores que se unían a las secuencias NP y GP, respectivamente, para amplificar selectivamente por RT-PCR solo las moléculas de ARN recombinadas supuestamente, que portan ORF de NP y GP en orientación ambisentido en un segmento de ARN. Los fragmentos de PCR resultantes se analizaron por electroforesis en gel (Fig. 5A). Los sueros de todos los portadores de r3LCMV-GFP^{nat} dieron lugar a productos de PCR dependientes de RT, mientras que los portadores de r3LCMV-GFP^{art} y los controles sin tratar no mostraron bandas específicas. Las reacciones de PCR de control se realizaron en muestras de ARN tratadas con simulación de RT para descartar contaminaciones de ADNc como fuente de producto de PCR. Los resultados de la secuenciación de tres portadores individuales de r3LCMV-GFP^{nat} se representan esquemáticamente en la Fig. 5C. Los tres ratones contenían segmentos de ARN viral de secuencias distintas, pero con un patrón similar: las porciones C-terminales de GP y NP se encontraron en orientación ambisentido en un segmento de ARN. Entre ellas, ambas regiones intergénicas, es decir, la del segmento que expresa NP y la del segmento original que expresa GP fueron retenidas al menos parcialmente, separadas por un fragmento de uno o ambos genes informadores de GFP en los segmentos S parentales del virus trisegmentado. La dirección y la longitud del fragmento de GFP variaron entre las tres especies de ARN recuperadas de ratones individuales, lo que era indicativo de eventos de recombinación independientes. En apoyo adicional de esta noción, se recuperó exactamente la misma secuencia de ARN recombinada de dos muestras consecutivas tomadas del mismo ratón con un intervalo de más de tres semanas entre el muestreo. En base a las secuencias del segmento S recombinadas obtenidas, propusimos un mecanismo molecular, como se describe esquemáticamente en la Fig. 7 y se describe en la leyenda de la figura, mediante el cual r3LCMV-GFP^{nat} recombina sus dos segmentos S, lo que da lugar a la pérdida transgénica y a la reversión fenotípica al virus de tipo salvaje. Los esquemas de la Fig. 7 también explican por qué, de acuerdo con el mecanismo propuesto de recombinación del segmento S, r3LCMV-GFP^{art} no puede recombinarse y reunir sus ORF de NP y GP en un segmento S funcional.

5.2.6 El r2LCMV recombinante con dos IGR en el segmento S es viable y crece a titulaciones similares a las del LCMV bisegmentado con solo una IGR en el segmento S.

Los datos de secuenciación anteriores revelaron un patrón consistente de elementos genéticos virales en segmentos S recombinados entre los cuales la duplicación (al menos parcial) de la IGR fue particularmente notable y característica. Sin embargo, los arenavirus con repeticiones de regiones intergénicas en un segmento S no se conocían. Sin embargo, un bucle de doble tallo se encuentra naturalmente en el arenavirus Mopeia del Viejo Mundo. Por lo tanto, clonamos el segmento S reordenado del portador #3 de r3LCMV-GFP^{nat} con las dos IGR y el remanente de GFP en un plásmido de expresión del segmento S dirigido por pol-I y rescatamos el virus respectivo. La cinética de crecimiento de este virus (r2LCMV_2IGRs) en las células BHK-21 se comparó con r3LCMV-GFP^{nat} trisegmentado y r2LCMV bisegmentado (Fig. 6). Las titulaciones infecciosas sin células de r2LCMV_2IGR excedieron las de r3LCMV-GFP^{nat} ya en los puntos de tiempo tempranos y alcanzó titulaciones máximas idénticas como r2LCMV (1,7 × 10⁷ PFU/ml frente a 1,6 × 10⁷ PFU/ml, respectivamente). Es importante destacar que r2LCMV_2IGRs creció a titulaciones máximas considerablemente más altas que su r3LCMV-GFP^{nat} trisegmentado parental, atestiguando la ventaja selectiva de la recombinación entre segmentos a pesar de la duplicación de la IGR durante este proceso.

5.2.7 El r3LCMV recombinante que expresa ovoalbúmina (OVA) induce una respuesta rápida, fuerte y polifuncional de células T CD8+ específicas de OVA.

Para ensayar la utilidad de la tecnología de administración del vector r3LCMV^{art} para fines de vacunación, generamos el vector de vacuna r3LCMV-OVA^{art} con una organización genómica análoga a r3LCMV-GFP^{art} (Fig. 1C), pero con dos genes de ovoalbúmina (OVA) en lugar de los genes de GFP respectivos en el último virus. Inmunizamos ratones C57BL/6 por vía intramuscular (i.m.) con 10⁴ PFU de r3LCMV-OVA^{art} y ocho días después analizamos la respuesta de las células T en el bazo. Para comparar con una plataforma de vector ampliamente utilizada, inmunizamos un segundo grupo de ratones C57BL/6 con 10⁸ partículas de un vector basado en adenovirus 5 con E1 deletado deficiente para la replicación que también expresa OVA (rAd5-OVA). La frecuencia de las células T CD8+ específicas de OVA que reconocen el epítipo SIINFEKL derivado de OVA inmunodominante estaba en el rango del 10 % de las células T CD8+ en el grupo de vacuna de r3LCMV-OVA^{art}, que fue significativamente mayor que en el grupo rAd5-OVA (Fig. 8A). Las respuestas de las células T CD8+ inducidas por r3LCMV-OVA^{art} no solo fueron de gran magnitud sino también altamente funcionales, según lo determinado por los ensayos de citoquinas intracelulares, lo que revela que la mayoría de las células T CD8+ inducidas por r3LCMV-OVA^{art} reactivas para SIINFEKL produjeron IFN-γ y en respuesta a la estimulación peptídica, y que una proporción considerable coprodujo TNF-α y/o IL-2. Esto demostró la utilidad de la tecnología del vector r3LCMV-OVA^{art} para la administración de vacunas.

5.2.8 El LCMV trisegmentado induce células T CD8+ de memoria polifuncionales.

Para abordar la cuestión de si los vectores r3LCMV inducen células T CD8+ de memoria funcionales, inmunizamos ratones C57BL/6 con 10e5 PFU de r3LCMV-OVA^{art} i.v. y analizamos las respuestas de células T CD8+ específicas de OVA (específicas de SIINFEKL) en el bazo en el día 25. Un grupo control de referencia de ratones se vacunó con

10e8 partículas virales (vp) de vector adenoviral (rAd) recombinante con E1 delecionado que expresaba OVA por la misma ruta. Las células T CD8+ específicas de OVA que producen IFN- γ , TNF- α y/o IL-2 tras la estimulación peptídica se evaluaron en ensayos de citoquinas intracelulares estándar tras la estimulación con péptidos SIINFEKL. Se determinó la frecuencia (Figura 9A) y el número absoluto (Figura 9B) de células productoras de citoquinas como se indica en el gráfico. Los ratones inmunes r3LCMV-OVA^{art} exhibieron frecuencias y números significativamente más altos de células T CD8+ específicas de OVA polifuncionales que coproducían IFN- γ /TNF- α e IFN- γ /TNF- α /IL-2 que los ratones inmunes rAd-OVA.

5.2.9 El LCMV que codifica el antígeno induce respuestas de células T específicas frente a antígenos extraños y propios.

Para investigar si los vectores r3LCMV^{art} pueden ser explotados para inducir respuestas de células T CD8 + frente a autoantígenos expresados en tumores, inmunizamos ratones BALB/c con vectores r3LCMV^{art} que expresan epítomos de células T CD8+ derivadas de Her2 de rata (TYVPANASL), humanos (TYLPTNASL) o de ratón (TYLPANASL) (Figura 10). Nueve días después, medimos las células T CD8 + específicas que producían IFN- γ , TNF- α y/o IL-2 tras la estimulación con los péptidos respectivos en ensayos de citoquinas intracelulares. La Figura 10 muestra las frecuencias de células T CD8+ específicas de epítomo como el porcentaje de células T CD8+ que producían la combinación de citoquinas indicada tras la estimulación con el péptido cognado. Las frecuencias de las células T CD8+ productoras de citoquinas tras la reestimulación con medio solo fueron insignificantes. Los resultados documentan que los vectores r3LCMV^{art} tienen la capacidad de inducir frecuencias sustanciales de respuestas de células T CD8+ reactivas con antígenos propios de tumor.

5.2.10 El interferón- α es inducido después de la infección con r3LCMV^{art}, pero no después de la infección con vectores recombinantes de adenovirus o vaccinia.

Los interferones tipo I pueden tener múltiples efectos inmunoestimuladores y antitumorales. Por lo tanto, la inducción del interferón tipo I puede representar una característica favorable de una vacuna viralmente vectorizada. Realizamos mediciones de ELISA para determinar las concentraciones de interferón alfa en el suero de ratones inmunizados con r3LCMV-OVA^{art}, rAd-OVA o virus vaccinia recombinante que expresa OVA (rVacc) 24, 48 o 72 horas antes (Figura 11). r3LCMV^{art}, pero no rAd ni rVacc, indujeron una respuesta sistémica de interferón alfa detectable y sostenida (al menos 48 horas). Esto atestigua la capacidad de los vectores r3LCMV^{art} para inducir fuertes respuestas inmunes innatas.

5.2.11 Crecimiento del cultivo celular de r3JUNV-GFP^{art} en comparación con r3JUNV-GFP^{nat} y la cepa parental de Junin, Candid #1.

Por analogía con los vectores r3LCMV-GFP^{nat} y r3LCMV-GFP^{art}, portadores de un genoma como se muestra en la Fig. 1B, preparamos por ingeniería r3JUNV-GFP^{nat} y r3JUNV-GFP^{art}, que consisten en vectores basados en la cepa de la vacuna Junin trisegmentado Cándida #1 que portan los genes de GFP en cada uno de sus dos segmentos S respectivos (r3JUNV-GFP^{nat} y r3JUNV-GFP^{art}). Ensayamos sus propiedades de crecimiento en células 293T, que infectamos a una multiplicidad de infección de 0,01 y recogimos el sobrenadante con el tiempo (Fig. 12). Encontramos que r3JUNV-GFP^{art} creció más lentamente que su cepa vacunal Junin bisegmentada parental Candid #1 (Fig. 12). Sin embargo, creció más rápido que r3JUNV-GFP^{nat}, (Fig. 12). Este comportamiento de crecimiento diferencial de los vectores basados en el virus Junin trisegmentado fue paralelo a las tasas de crecimiento de los vectores r3LCMV-GFP^{nat} y r3LCMV-GFP^{art} (Fig. 1D).

5.2.12 JUNV trisegmentados son dramáticamente atenuados *in vivo*, y r3JUNV-GFP^{nat}, pero no r3JUNV-GFP^{art}, pierde la expresión de GFP después de una replicación prolongada *in vivo*.

Para investigar la estabilidad genética de r3JUNV-GFP^{nat} y r3JUNV-GFP^{art}, infectamos ratones AGRAG (IFN α / β R-/-, IFN γ R-/-, RAG-/-) con 7x10e4 PFU de cualquiera de estos vectores que expresan GFP. Para fines de comparación, un tercer grupo se infectó con el virus Candid #1 bisegmentado de tipo salvaje. El último virus se detectó fácilmente en la sangre de todos los ratones infectados sobre el día 20 después de la infección (Figura 13A), mientras que los virus trisegmentados permanecieron indetectables durante al menos 40 días. Este hallazgo documentó el crecimiento atenuado *in vivo* como resultado de la reorganización del genoma, extendiendo nuestros hallazgos con los vectores r3LCMV-GFP en la Fig. 4A a los vectores basados en Junin. Después del día 40, r3JUNV-GFP^{nat} y r3JUNV-GFP^{art} también fueron detectables en varios animales en cada grupo (Figura 13A). Sin embargo, es importante destacar que algunos de los ratones infectados con r3JUNV-GFP^{nat} alcanzaron cargas virales en el rango de los ratones infectados con Candid #1 de tipo salvaje, mientras que los ratones infectados con r3JUNV-GFP^{art} virémicos retuvieron una carga viral más baja que los controles infectados con Candid #1.

Para determinar si la población de virus dominante en estos animales virémicos todavía portaba el gen informador de GFP, dando lugar así a la expresión de GFP en las células infectadas, realizamos ensayos de formación de focos virales con muestras de sangre de portadores de r3JUNV-GFP^{nat} y r3JUNV-GFP^{art} tomadas en el día 120 después de la infección. Comparamos las titulaciones infecciosas de virus que retienen la expresión de GFP (anti-GFP, Fig. 13B) y la infectividad total del virus Junin (anti-NP, Fig. 13B). Las titulaciones de r3JUNV-GFP^{art} estaban en rangos similares cuando se determinaron mediante un ensayo de inmunofoco anti-GFP o anti-NP, documentando que la mayoría de la

población de virus retuvo la expresión de GFP. Por el contrario, en la sangre de los cuatro animales infectados con r3JUNV-GFP^{nat} con la viremia más alta (comparable a Candid #1 tipo salvaje), la titulación infecciosa anti-GFP fue al menos 10 veces menor que la titulación infecciosa total según se determinó mediante tinción de NP. Esto documentó que r3JUNV-GFP^{art}, pero no r3JUNV-GFP^{nat}, retuvo de forma estable el transgén de GFP *in vivo*.

- 5 5.2.13 Las combinaciones homólogas y heterólogas de cebado-refuerzo de vectores de vacuna basados en LCMV y JUNV trisegmentados inducen fuertes respuestas de células T CD8+ específicas de autoantígeno P1A.

A continuación investigamos si los vectores basados en r3LCMV^{art} y r3JUNV^{art} pueden usarse en combinaciones homólogas y heterólogas de cebado-refuerzo para inducir respuestas de células T CD8+ específicas de autoantígeno tumoral. Construimos vectores basados en r3LCMV^{art} y r3JUNV^{art} que expresan el autoantígeno P1A derivado de mastocitoma de ratón P815 (SEQ ID NO: 24) (r3LCMV-P1A^{art} (SEQ ID NO: 18, 19, 20) y r3JUNV-P1A^{art} (SEQ ID NO: 21, 22, 23)). Estas construcciones de vacunas se usaron para inmunizar ratones BALB/c i.v. en combinaciones homólogas y heterólogas de cebado-refuerzo como se muestra en la Figura 14. Tanto r3LCMV-P1A^{art} como r3JUNV-P1A^{art} indujeron células T CD8+ específicas del epítipo P1A cuando se administraron en vacunación homóloga de cebado-refuerzo, según se determinó a partir de sangre usando tetrámeros H-2L^d cargados con el péptido LPYLGWLVF (epítipo P1A 35-43). Las frecuencias medias de las células T CD8+ específicas del epítipo en el día 63 del experimento fueron del 1,2 % (r3JUNV-P1A^{art}) y 3,9 % (r3LCMV-P1A^{art}), respectivamente. Además, los animales cebados con r3JUNV-P1A^{art} y reforzados con r3LCMV-P1A^{art} de manera heteróloga, produjeron respuestas aún más altas con frecuencias promedio de células T CD8+ específicas del epítipo del 19,5 % en el día 63. Las frecuencias de animales cebados con r3LCMV-P1A^{art} y reforzados con r3JUNV-P1A^{art} (3,1%) fueron comparables a aquellos sometidos a vacunación homóloga de cebado-refuerzo con r3LCMV-P1A^{art}.

7. Listado de secuencias

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
1	Segmento S de LCM, secuencia completa. El segmento genómico es ARN, la secuencia en SEQ ID NO: 1 se muestra para ADN; sin embargo, el intercambio de todas las timidinas ("T") en SEQ ID NO: 1 por uridinas ("U") proporciona la secuencia de ARN.	cgcacccgggg atcctaggct ttttgattg cgctttcctc tagatcaact ggggtgcagg 60

ES 2 811 093 T3

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
		ccctatccta cagaaggatg ggtcagattg tgacaatggt tgaggctctg cctcacatca 120 tcgatgaggt gatcaacatt gtcattattg tgcttatcgt gatcacgggt atcaaggctg 180 totacaattt tgccacctgt gggatattcg cattgatcag tttcctactt ctggctggca 240 ggtcctgtgg catgtacggg cttaaagggac cggacattta caaaggagt taccattta 300 agtcagtga gtttgatag tcacatctga acctgacct gcccaacgca tgttcagcca 360 acaactccca ccattacatc agtatgggga cttctggact agaattgacc ttcaccaatg 420 attccatcat cagtcacaac ttttgcaatc tgacctctgc cttcaacaaa aagacctttg 480 accacacact catgagtata gtttcgagcc tacacctcag tatcagaggg aactccaact 540 ataaggcagt atcctgcgac tccaacaatg gcataacct ccaatacaac ttgacattct 600 cagatcgaca aagtgctcag agccagtgtg gaaccttcag aggtagagtc ctagatagt 660 ttagaactgc cttcgggggg aaatacatga ggagtggctg gggctggaca ggctcagatg 720 gcaagaccac ctgggtgtagc cagacgagtt accaatacct gattatacaa aatagaacct 780 gggaaaacca ctgcacatat gcaggtcctt ttgggatgtc caggattctc ctttccaag 840 agaagactaa gttccttcaact aggagactag cgggcacatt cacctggact ttgtcagact 900 cttcaggggt ggagaatcca ggtggttatt gctgaccaa atggatgatt cttgctgcag 960 agcttaagtg tttcgggaac acagcagttg cgaaatgcaa tgtaaatcat gatgccgaat 1020 tctgtgacat gctgcgacta attgactaca acaaggctgc tttgagtaag tccaagagg 1080 acgtagaatc tgccttgcac ttattcaaaa caacagtgaa ttctttgatt tcagatcaac 1140 tactgatgag gaaccacttg agagatctga tgggggtgcc atattgcaat tactcaaagt 1200 tttggtacct agaacatgca aagaccggcg aaactagtggt ccccaagtgc tggcttgtca 1260 ccaatgggtc ttacttaaat gagaccact tcagtgatca aatcgaaacag gaagccgata 1320 acatgattac agagatggtg aggaaggatt acataaagag gcaggggagt acccccctag 1380 cattgatgga cttctctgatg tttccacat ctgcatact agtcagcatc ttctgcacc 1440 ttgtcaaat accaacacac aggcacataa aaggtggctc atgtccaaag ccacaccgat 1500 taaccaacia aggaatttgt agttgtggtg catttaaggt gcctggtgta aaaaccgtct 1560 ggaaaagacg ctgaagaaca gcgcctccct gactctccac ctcgaaagag gtggagagtc 1620 agggaggccc agagggtctt agagtgtcac aacatthggg cctctaaaaa ttaggtcatg 1680 tggcagaatg ttgtgaacag tttcagatc tgggagcctt gctttggagg cgctttcaaa 1740 aatgatgcag tccatgagtg cacagtgcgg ggtgatctct ttcttctttt tgtcccttac 1800 tattccagta tgcatttac acaaccagcc atatthgtcc cacactthgt cttcactc 1860 cctcgaagct tccttggta tttcaacatc

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
		gataagctta atgtccttcc tattctgtga 1920 gtccagaagc tttctgatgt catcggagcc ttgacagctt agaaccatcc cctgcggaag 1980 agcacctata actgacgagg tcaacccggg ttgcgcatg aagaggctcg caagatccat 2040 gccgtgtgag tacttggaat cttgcttgaa ttgtttttga tcaacgggtt ccctgtaaaa 2100 gtgatgaac tgcccgttct gtggttggaa aattgctatt tccactggat cattaaatct 2160 accctcaatg tcaatccatg taggagcgtt ggggtcaatt cctcccatga ggtcttttaa 2220 aagcattgtc tggctgtagc ttaagcccac ctgaggtgga cctgctgctc cagggcctgg 2280 cctgggtgaa ttgactgcag gtttctcgct tgtgagatca attgttgtgt tttcccctgc 2340 tctccccaca atcgatgttc tacaagctat gtatggccat ccttcacctg aaaggcaaac 2400 tttatagagg atgttttcat aagggttcct gtccccaaact tggctgaaa caaacatggt 2460 gagttttctc ttggccccga gaactgcctt caagaggctc tcgctgttgc ttggcttgat 2520 caaaattgac tctaacatgt taccctcctc caacagggct gccctgcct tcacggcagc 2580 accaagacta aagttatagc cagaaatggt gatgctggac tgctgttccag tgatgacccc 2640 cagaactggg tgcttgtctt tcagcctttc aagatcatta agatttgat acttgactgt 2700 gtaaagcaag ccaaggtctg tgagcgttgg tacaacgtca ttgagcggag tctgtgactg 2760 tttggccata caagccatag ttgacttgg cattgtgcca aattgattgt tcaaaaagtga 2820 tgagtctttc acatcccaaa ctcttaccac accacttgca ccctgctgag gctttctcat 2880 cccaactatc tgtaggatct gagatctttg gtctagtgtc tgtgttggtta agttccccat 2940 atatacccct gaagcctggg gcctttcaga cctcatgatc ttggccttca gcttctcaag 3000 gtgagccgca agagacatca gttcttctgc actgagcctc cccactttca aaacattctt 3060 ctttgatgtt gactttaaat ccacaagaga atgtacagtc tggttgagac ttctgagtct 3120 ctgtaggctt ttgtcatctc tcttttcctt cctcatgatc ctctgaacat tgctgacctc 3180 agagaagtcc aaccatttca gaaggttggg tgcattcctta atgacagcag ccttcacatc 3240 tgatgtgaag ctctgcaatt ctcttctcaa tgcttgctc catttgaagc tcttaacttc 3300 cttagacaag gacatcttgt tgctcaatgg tttctcaaga caaatgcgca atcaaatgcc 3360 tagqatccac tqtgcg
2	Segmento S del Clon 13 de LCMV, secuencia completa (GenBank: DQ361065.2). El segmento genómico es ARN, la secuencia en la SEQ ID NO: 2 se muestra para ADN; sin embargo, el intercambio de todas las timidinas ("T") en la SEQ ID NO: 2 por uridinas ("U") proporciona la secuencia de ARN.	gcgcaccggg gatcctaggc tttttggatt gcgctttcct ctagatcaac tgggtgtcag 60 gccctatcct acagaaggat gggctcagatt gtgacaatgt ttgaggctct gcctcacatc 120 atcgatgagg tgatcaacat tgtcattatt gtgcttatcg tgatcacggg tatcaaggct 180 gtctacaatt ttgccacctg tgggatattc gcattgatca gtttctact tctggctggc 240 aggtcctgtg gcatgtacgg tcttaaggga cccgacattt acaaaggagt ttaccaattt 300 aagtcaqtgg agtttgatat gtcacatctg

ES 2 811 093 T3

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
		aacctgacca tgcccaacgc atgttcagcc 360
		aacaactccc accattacat cagtatgggg 420
		acttctggac tagaattgac cttcaccaat 420
		gattccatca tcagtcacaa cttttgcaat 480
		ctgacctctg ccttcaacaa aaagaccttt 480
		gaccacacac tcatgagtat agtttcgagc 540
		ctacacctca gtatcagagg gaactccaac 540
		tataaggcag tatcctgcca cttcaacaat 600
		ggcataacca tccaatacaa cttgacattc 600
		tcagatgcac aaagtgcaca gagccagtg 660
		agaaccttca gaggtagagt cctagatatg 660
		tttagaactg ccttcggggg gaaatacatg 720
		aggagtggct ggggctggac aggctcagat 720
		ggcaagacca cctggtgtag ccagacgagt 780
		taccaatacc tgattatata aaatagaacc 780
		tgggaaaacc actgcacata tgcaggctct 840
		tttgggatgt ccaggattct cctttcccaa 840
		gagaagacta agttcctcac taggagacta 900
		gcgggcacat tcacctggac ttgtcagac 900
		tcttcagggg tggagaatcc aggtggttat 960
		tgctgacca aatggatgat tcttgctgca 960
		gagcttaagt gtttcgggaa cacagcagtt 1020
		gcgaaatgca atgtaaatca tgatgaagaa 1020
		ttctgtgaca tgctgcgact aattgactac 1080
		aacaaggctg ctttgagtaa gttcaaagag 1080
		gacgtagaat ctgccttgca cttattcaaa 1140
		acaacagtga attccttgat ttcagatcaa 1140
		ctactgatga ggaaccactt gagagatctg 1200
		atgggggtgc catattgcaa ttaactcaaag 1200
		ttttggtacc tagaacatgc aaagaccggc 1260
		gaaactagtg tccccaaagt ctggcttgtc 1260
		accaatggtt cttacttaa tgagaccac 1320
		ttcagtgacc aaatcgaaac ggaagccgat 1320
		aacatgatta cagagatggt gaggaaggat 1380
		tacataaaga ggcaggggag taccoccta 1380
		gcattgatgg accttctgat gttttccaca 1440
		tctgcataatc tagtcagcat cttcctgcac 1440
		cttgtcaaaa taccaacaca caggcacata 1500
		aaaggtggct catgtccaaa gccacaccga 1500
		ttaaccaaca aaggaatttg tagttgtggt 1560
		gcatttaagg tgctggtggt aaaaaccgtc 1560
		tggaaaagac gctgaagaac agcgctccc 1620
		tgactctcca cctcgaaaga ggtggagagt 1620
		cagggaggcc cagaggtct tagagtgtca 1680
		caacatttgg gcctcaaaa attaggtcat 1680
		gtggcagaat gttgtgaaca gttttcagat 1740
		ctgggagcct tgctttggag gcgctttcaa 1740
		aatgatgca gtccatgagt gcacagtgcg 1800
		gggtgatctc tttcttctt ttgtccctta 1800
		ctattccagt atgcatctta cacaaccagc 1860
		catatttgtc ccacactttg tcttcatact 1860
		ccctcgaagc ttcctggtc atttcaacat 1920
		cgataagctt aatgtccttc ctattctgtg 1920
		agtccagaag ctttctgatg tcatcggagc 1980
		cttgacagct tagaacatc cctgcggaa 1980
		gagcacctat aactgacgag gtcaaccgg 2040
		gttgcgcat gaagaggtcg gcaagatcca 2040
		tgccgtgtga gtactggaa tcttgcttga 2100
		attgtttttg atcaaccgggt tcctgtaaa 2100
		agtgtatgaa ctgcccgttc tgtggttgg 2160
		aaattgctat ttccactgga tcattaaatc 2160

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
		taccctcaat gtcaatccat gtaggagcgt tggggtcaat tcctcccatg aggtctttta 2220 aaagcattgt ctggctgtag cttaaagcca cctgaggtgg acctgctgct ccaggcgcctg 2280 gcctgggtga attgactgca ggtttctcgc ttgtgagatc aattggttggt tttcccatg 2340 ctctccccac aatcgatggt ctacaagcta tgatggcca tccttcacct gaaaggcaaa 2400 ctttatagag gatgttttca taagggttcc tgcccccaac ttggtctgaa acaaacatgt 2460 tgagttttct cttggccccg agaactgcct tcaagaggtc ctgctgttg cttggcttga 2520 tcaaaattga ctctaacatg ttacccccat ccaacagggc tgccccctgcc ttcacggcag 2580 caccaagact aaagttatag ccagaaatgt tgatgctgga ctgctgttca gtgatgacct 2640 ccagaactgg gtgcttgtct ttcagccttt caagatcatt aagatttgga tacttgactg 2700 tgtaaagcaa gccaaaggct gtgagcgcct gtacaacgct attgagcggg gtctgtgact 2760 gtttggccat acaagccata gttagacttg gcattgtgcc aaattgattg ttcaaaagtg 2820 atgagtcttt cacatcccaa actcttacca caccacttgc accctgctga ggctttctca 2880 tcccaactat ctgtaggatc tgagatcttt ggtctagtgt ctgtgttgtt aagttcccca 2940 tatatacccc tgaagcctgg gccctttcag acctcatgat cttggccttc agcttctcaa 3000 ggtcagccgc aagagacatc agttcttctg cactgagcct ccccactttc aaaacattct 3060 tctttgatgt tgactttaaa tccacaagag aatgtacagt ctgggtgaga cttctgagtc 3120 tctgtaggtc tttgtcatct ctcttttctt tcctcatgat cctctgaaca ttgctgacct 3180 cagagaagtc caaccattc agaaggttgg ttgcatcctt aatgacagca gccttcacat 3240 ctgatgtgaa gctctgcaat tctcttctca atgcttgcgt ccattggaag ctcttaactt 3300 ccttagacaa ggacatcttg ttgctcaatg gtttctcaag acaaatgcgc aatcaaatgc 3360 ctaqqatcca ctgtgcg
3	Segmento L del Clon 13 de LCMV, secuencia completa (GenBank: DQ361066.1). El segmento genómico es ARN, la secuencia en la SEQ ID NO: 3 se muestra para ADN; sin embargo, el intercambio de todas las timidinas ("T") en la SEQ ID NO: 3 por uridinas ("U") proporciona la secuencia de ARN.	gcgcaccggg gatcctaggc gtttagttgc gctgtttggt tgcacaactt tcttcgtgag 60 gctgtcagaa gtggacctgg ctgatagcga tgggtcaagg caagtccaga gaggagaaag 120 gcaccaatag tacaacacagg gccgaaatcc taccagatac cacctatctt ggccctttaa 180 gctgcaaatc ttgctggcag aaatttgaca gcttggtgtaag atgccatgac cactaccttt 240 gcaggcactg tttaaacctt ctgctgtcag tatccgacag gtgtcctctt tgtaaatact 300 cattaccaac cagattggaag atatcaacag ccccaagctc tccacctccc tacgaagagt 360 aacaccgtcc ggccccggcc ccgacaaca gcccagcaca agggaaaccgc acgtcaccca 420 acgcacacag acacagcacc caacacagaa cagcacaaca cacacacaca cacaccaca 480 cgcacgcgcc cccaccaccg gggggcgccc cccccggggg ggccggcccc cgggagccc 540 ggccggagccc cacggagatg cccatcagtc gatgtcctcg gccaccgacc cccccagcca 600

ES 2 811 093 T3

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
		atcgtcgcag gacctccct tgagtctaaa cctgcccccc actgtttcat acatcaaagt 660 gctoctagat ttgctaaaac aaagtctgca atccttaaag gcgaaccagt ctggcaaaag 720 cgacagtgga atcagcagaa tagatctgtc tatacatagt tcctggagga ttacacttat 780 ctctgaacc acaaatgtt caccagttct gaatcgatgc aggaagaggt tccaaggac 840 atcactaatc ttttcatagc cctcaagtcc tgctagaaag actttcatgt ccttggcttc 900 cagcttcaca atgatatttt ggacaaggtt tcttccttca aaaaggcac ccatctttac 960 agtcagtggc acaggctccc actcaggtcc aactctctca aagtcaatag atctaattccc 1020 atccagtatt cttttggagc ccaacaactc aagctcaaga gaatcaccaa gtatcaaggg 1080 atcttccatg taatcctcaa actcttcaga tctgatatca aagacacat cgttcacctt 1140 gaagacagag tctgtcctca gtaagtggag gcattcatcc aacattcttc tatctatctc 1200 acccttaaag aggtgagagc atgataaaaag ttcagccaca cctggattct gaattggca 1260 cctaaccaag aatatcaatg aaaatttcct taaacagtca gtattattct gattgtgcgt 1320 aaagtccact gaaattgaaa actccaatac cccttttgtg tagttgagca ttagtccca 1380 cagatccctt aaggatttaa atgctttgg gtttgtcagg ccctgcctaa tcaacatggc 1440 agcattacac acaacatctc ccattcggta agagaaccac ccaaaaccaa actgcaaatc 1500 attcctaaac ataggcctct ccacattttt gttcaccacc tttgagacaa atgattgaaa 1560 ggggcccagt gcctcagcac catcttcaga tggcatcatt tctttatgag ggaaccatga 1620 aaaattgect aatgtcctgg ttgttgaac aaattctcga acaaatgatt caaaatcac 1680 ctgttttaag aagttcttgc agacatccct cgtgctaaca acaaatcat caaccagact 1740 ggagtccagat cgctgatgag aattggcaag gtcagaaaac agaacagtgt aatgttcac 1800 ccttttccac ttaacaacat gagaatgag tgacaaggat tctgagttaa tatcaattaa 1860 aacacagagg tcaaggaaat taattctggg actccacctc atgttttttg agctcatgtc 1920 agacataaat ggaagaagct gatcctcaa gatcttggga tatagccgcc tcacagattg 1980 aatcacttgg ttcaaatca ctttgcctc cagtagcctt gagctctcag gctttcttgc 2040 tacataatca catgggttta agtgcttaag agttaggttc tcaactgtat tcttccctt 2100 ggtcggttct gctaggacc aaacacccaa ctcaaaagag ttgctcaatg aaatacaaat 2160 gtagtcccaa agaagaggcc ttaaaaggca tatatgatca cgggtggctt ctggatgaga 2220 ctgtttgtca caaatgtaca gcgttatacc atcccattg caaactcttg tcacatgatc 2280 atctgtggtt agatcctcaa gcagctttt gatatacaga ttttccctat tttgtttct 2340 cacacacctg cttcctagag ttttgaaaag gcctataaag ccagatgaga tacaactctg 2400 gaaaqctgac ttgttgattg cttctgacag

ES 2 811 093 T3

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
		cagcttctgt gcacccttg tgaatttact 2460
		acaaagtttg ttctggagtg tcttgatcaa
		tgatgggatt ctttcctctt ggaaagtcatt 2520
		cactgatgga taaaccacct tttgtcttaa
		aaccatcctt aatgggaaca tttcattcaa 2580
		attcaaccag ttaacatctg ctaactgatt
		cagatcttct tcaagaccga ggaggctcc 2640
		caattgaaga atggcctctt tttatctct
		gttaaatagg tctaagaaaa attcttcatt 2700
		aaattcacca tttttgagct tatgatgcag
		tttccttaca agctttctta caacctttgt 2760
		ttcattagga cacagttcct caatgagtct
		ttgtattctg taacctctag aaccatccag 2820
		ccaatctttc acatcagtg tggtattcag
		tagaaatgga tccaaagga aattggcata 2880
		ctttaggagg tccagtgctt tcctttggat
		actattaact agggagactg ggacgccatt 2940
		tcgatggct tgatctgcaa ttgtatctat
		tgtttcacaa agttgatgtg gctctttaca 3000
		cttgacattg tgtagcgtg cagatacaaa
		ctttgtgaga agagggactt cctccccca 3060
		tacatagaat ctagatttaa attctgcagc
		gaacctccca gccacacttt ttgggctgat 3120
		aaatttgttt aacaagccgc tcagatgaga
		ttggaattcc aacaggacaa ggacttcctc 3180
		cggatcactt acaaccaggt cactcagcct
		cctatcaaat aaagtgatct gatcatcact 3240
		tgatgtgtaa gcctctggtc tttcgccaaa
		gataacacca atgcagtagt tgatgaacct 3300
		ctcgtaagc aaaccataga agtcagaagc
		attatgcaag attccctgcc ccatatcaat 3360
		aaggctggat atatgggatg gcactatccc
		catttcaaaa tattgtctga aaattctctc 3420
		agtaacagtt gtttctgaac cctgagaag
		ttttagcttc gacttgacat atgatttcat 3480
		cattgcattc acaacaggaa aggggacctc
		gacaagctta tgcattgtcc aagttaacaa 3540
		agtgctaaca tgatctttcc cggaacgcac
		atactgggtca tcacctagt ttagattttg 3600
		tagaaacatt aagaacaaaa atgggacacat
		cattgggtccc catttgctgt gatccatact 3660
		atagtttaag aaccttccc gcacattgat
		agtcattgac aagattgcat tttcaaattc 3720
		cttatcattg tttaaacagg agcctgaaaa
		gaaacttgaa aaagactcaa ataactctc 3780
		tattaacctt gtgaacattt ttgtcctcaa
		atctccaata tagagttctc tatttcccc 3840
		aacctgctct ttataagata gtgcaaattt
		cagccttcca gagtcaggac ctactgaggt 3900
		gtatgatgtt ggtgattctt ctgagtagaa
		gcacagattt ttcaaagcag cactcataca 3960
		ttgtgtcaac gacagagctt tactaaggga
		ctcagaatta ctttcctct cactgattct 4020
		cacgtcttct tccagtttg cccagtcaaa
		tttgaaattc aagccttgcc tttgcatatg 4080
		cctgtatttc cctgagtaoc catttgcat
		catttgcaac agaatcatct tcatgcaaga 4140
		aaaccaatca ttctcagaaa agaactttct
		acaaaggttt tttgccatct catcgaggcc 4200
		acactgatct ttaatgactg aggtgaaata
		caaaggtgac agctctgtgg aacctcaac 4260

ES 2 811 093 T3

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
		agcctcacag ataaaattcoa tgcatacatt ggtagacat gatgggtcaa agtcttctac 4320 taaatggaaa gatatttctg acaagataac ttttcttaag tgagccatct tccctgtag 4380 aataagctgt aaatgatgta gtccttttgt atgtgtaagt ttttctccat ctctttgtc 4440 attggccctc ctacctctc tgtaccgtgc tattgtgggtg ttgacctttt cttcgagact 4500 tttgaagaag cttgtctctt cttctccatc aaaacatatt tctgccagggt tgccttccga 4560 tctccctgtc tcttctccct tggaaaccgat gaccaatcta gagactaact tggaaacttt 4620 atattcatag tctgagtggc tcaacttata cttttgtttt cttacgaaac tctccgtaat 4680 ttgactcaca gcaactaaca gcaatttght aaagtcatat tccagaagtc gttctccatt 4740 tagatgctta ttaaccacca cacttttght actagcaaga tctaattgctg tgcacatcc 4800 agagttagtc atgggatcta ggctgttag cttcttctct cctttgaaaa ttaaagtgcc 4860 gttggttaaat gaagacacca ttaggctaaa ggcttccaga ttaacacctg gagttgtatg 4920 ctgacagtca atttctttac tagtgaatct cttcatttgc tcatagaaca cacattcttc 4980 ctcaggagtg attgcttctt tggggttgac aaaaaaaaacca aattgacttt tgggctcaaa 5040 gaacttttca aaacatttta tctgatctgt tagcctgtca ggggtctctt ttgtgatcaa 5100 atgacacagg tatgacacat tcaacataaa tttaaatttt gcaactcaaca acacttctc 5160 accagtacca aaaatagttt ttattaggaa tctaagcagc ttatacacca ccttctcagc 5220 aggtgtgatc agatcctccc tcaacttatc cattaatgat gtagatgaaa aatctgacac 5280 tattgccatc accaaatata tgacactctg tacctgcttt tgatttctct ttgttgggtt 5340 ggtgagcatt agcaacaata gggctctcag tgcaacctca atgtcgggtga gacagtcttt 5400 caaatcagga catgatctaa tccatgaaat catgatgtct atcatattgt ataagacctc 5460 atctgaaaaa attggtaaaa agaactttt aggatctgca tagaaggaaa ttaaatgacc 5520 atccgggcct tgtatggagt agcaccttga agattctcca gtcttctggg ataatagggtg 5580 gtattcttca gagtccagtt ttattacttg gcaaaacact tctttgcatt ctaccacttg 5640 atatctcaca gaccctattt gattttgctt tagtctagca actgagctag ttttcatact 5700 gtttgttaag gccagacaaa cagatgataa tcttctcagg ctctgtatgt tcttcagctg 5760 ctctgtgctg ggttggaaa tghtaatctt aaacttcgta taatacatta tcgggtgagc 5820 tccaattttc ataaagtctt caaattcagt gaatgggatg tggcattctt gctcaagggtg 5880 ttcagacagt ccgtaatgct cgaacctcag tcccaccact aacaggcatt tttgaatttt 5940 tgcaatgaac tcactaatag atgcctaaa caattcctca aaagacacct ttctaaacac 6000 ctttgacttt tttctattcc tcaaaaagtct aatgaactcc tctttagtgc tgtgaaagct 6060 taccagccta tcattcacac tactataqca

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
		acaaccaccc cagtgtttat catttttttaa 6120 ccctttgaat ttcgactggt ttatcaatga ggaaagacac aaaacatcca gatttaacaa 6180 ctgtctcctt ctagtattca acagtttcaa actcttgact ttgtttaaca tagagaggag 6240 cctctcatat tcagtgctag tctcacttcc cctttcgtgc ccatgggtct ctgcagttat 6300 gaatctcatc aaaggacagg attcgactgc ctccctgctt aatgttaaga tatcatcact 6360 atcagcaagg ttttcataga gctcagagaa ttcttgatc aagccttcag ggttactttt 6420 ctgaaagttt ctctttaatt tcccactttc taaatctctt ctaaacctgc tgaaaagaga 6480 gtttattcca aaaaccacat catcacagct catgttgggg ttgatgcctt cgtggcacat 6540 cctcataatt tcatcattgt gagttgacct cgcactcttc agaattttca tagagtccat 6600 accggagcgc ttgtcgatag tagtcttcag ggactcacag agtctaaaa attcagactc 6660 ttcaaagact ttctcatttt ggttagaata ctccaaaagt ttgaataaaa ggtctctaaa 6720 tttgaagttt gccactctg gcataaaact attatcataa tcacaacgac catctactat 6780 tggactaat gtgacaccog caacagcaag gtcttccctg atgcatgoca atttgttagt 6840 gtctctata aatttcttct caaaactggc tggagtgctc ctaacaaaac actcaagaag 6900 aatgagagaa ttgtctatca gcttgaacc atcaggaatg ataagtggta gtcctgggca 6960 tacaattcca gactccacca aaattgtttc cacagactta tcgtcgtggt tgtgtgtgca 7020 gccactcttg tctgcactgt ctatttcaat gcagcgtgac agcaacttga gtcctcaat 7080 cagaaccatt ctgggttccc tttgtcccag aaagttgagt ttctgccttg acaacctctc 7140 atctgttct atatagttta aacataactc tctcaattct gagatgattt catccattgc 7200 gcatcaaaaa gcctaggatc ctcggtgcg 7229
4	Segmento L de la cepa MP de LCMV, secuencia completa. El segmento genómico es ARN, la secuencia en la SEQ ID NO: 4 se muestra para ADN; sin embargo, el intercambio de todas las timidinas ("T") en la SEQ ID NO: 4 por uridinas ("U") proporciona la secuencia de ARN.	gcgcaccggg gatcctagggc atttttgttg cgcattttgt tgtgttattt gttgcacagc 60 ccttcatcgt gggaccttca caaacaacc aaaccaccag ccatgggcca aggcaagtcc 120 aaagagggaa gggatgccag caatacagac agagctgaaa ttctgccaga caccacctat 180 ctcggaacctc tgaactgcaa gtcatgctgg cagagatttg acagtttagt cagatgccat 240 gaccactatc tctgcagaca ctgcctgaac ctctgctgt cagtctcga caggtgcct 300 ctctgcaaac atccattgcc aaccaaaactg aaaatatcca oggccccaaag ctctccacc 360 ccttacgagg agtgacgccc cgagccccaa caccgacaca aggaggccac caacacaacg 420 cccaacacgg aacacacaca cacacacca cacacacatc cacacacacg cgcacctaca 480 acggggggcgc cccccgggg gtggcccccc gggtgctcgg gcggagcccc acggagaggc 540 caattagtcg atctcctcga ccaccgactt ggtcagccag tcatcacagg acttgcctt 600 aagtctgtac ttgccacaa ctgtttcata catcaccgtg ttctttgact tactgaaaca 660

ES 2 811 093 T3

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
		tagcctacag tctttgaaag tgaaccagtc aggcacaagt gacagcggta ccagtagaat 720 ggatctatct atacacaact ctgggagaat tgtgctaatt tccgaccctt gtagatgctc 780 accagttctg aatcgatgta gaagaaggct ccaaggacg tcatcaaaat ttccataacc 840 ctcgagctct gccaaagaaa ctctcatatc cttggctctc agtttcacaa cgatgttctg 900 aacaaggctt ctccctcaa aaagagcacc cattctcaca gtcaagggca caggctccca 960 ttcaggccca atcctctcaa aatcaaggga tctgatcccg tccagtattt tcttgagcc 1020 tatcagctca agctcaagag agtcaccgag tatcaggggg tctccatat agtcctcaa 1080 ctcttcagac ctaatgtcaa aaacaccatc gttcaccttg aagatagagt ctgatctcaa 1140 caggtggagg cattcgtcca agaaccttct gtccacctca cctttaaaga ggtgagagca 1200 tgataggaac tcagctacac ctggacctg taactggcac ttcactaaaa agatcaatga 1260 aaacttcctc aaacaatcag tgttattctg gttgtgagtg aaatctactg taattgagaa 1320 ctctagcact cctctgtat tatttatcat gtaatccac aagtttctca aagaottgaa 1380 tgcttttggg tttgtcaagc ctgtgttgat tagcatggca gcattgcaca caatatctcc 1440 caatcggtaa gagaaccatc caaatccaaa ttgcaagtca ttctaaaca tgggcctctc 1500 catatTTTTG ttcactactt ttaagatgaa tgattggaaa ggcccaatg cttcagcgcc 1560 atcttcagat ggcacatgt ctttatgagg gaaccatgaa aaacttccta gaggttctgct 1620 tgttgctaca aattctctgta caaatgactc aaaatacact tgttttaaaa agtttttgca 1680 gacatccctt gtactaacga caaattcatc aacaaggctt gagtccagagc gctgatggga 1740 atttacaaga tcagaaaata gaacagtgta gtgttcgtcc ctctccact taactacatg 1800 agaaatgagc gataaagatt ctgaattgat atcgatcaat acgcaaaggt caaggaattt 1860 gattctggga ctccatctca tgttttttga gctcatatca gacatgaagg gaagcagctg 1920 atcttcatag attttagggg acaatcgct cacagattgg attacatggg ttaaacttat 1980 cttgtcctcc agtagccttg aactctcagg cttccttgct acataatcac atgggttcaa 2040 gtgcttgagg cttagacttc cctcattctt ccctttcaca ggttcagcta agacccaaac 2100 acccaactca aaggaattac tcagtgagat gcaaatatag tcccaaagga ggggcctcaa 2160 gagactgatg tggctcgcagt gagcttctgg atgactttgc ctgtcacaaa tgtacaacat 2220 tatgccatca tgtctgtgga ttgctgtcac atgcgcatcc atagctagat cctcaagcac 2280 ttttctaagt tatagattgt cctatTTTT 2340 atcttcaca catctacttc ccaaagtttt gcaaagacct ataaagcctg atgagatgca actttgaaag gctgacttat tgattgcttc 2400 tgacagcaac ttctgtgcac ctctgtgaa cttactgcag agcttgttct ggagtgtctt 2460 gattaatgat gggattcttt cctcttgaaa

ES 2 811 093 T3

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia	
		agtcattact gatggataaa ccactttctg	2520
		cctcaagacc attcttaatg ggaacaactc	
		attcaaattc agccaattta tgtttgccaa	2580
		ttgacttaga tcctcttcga ggccaaggat	
		gtttccaac tgaagaatgg ctctcttttt	2640
		atccctattg aagaggtcta agaagaattc	
		ttcattgaac tcaccattct tgagcttatg	2700
		atgtagtctc cttacaagcc ttctcatgac	
		cttcgtttca ctaggacaca attcttcaat	2760
		aagcctttgg attctgtaac ctctagagcc	
		atccaaccaa tccttgacat cagtattagt	2820
		gttaagcaaa aatgggtcca agggaaagtt	
		ggcatatfff aagaggtcta atgttctctt	2880
		ctggatgcag ttaccfaatg aaactggaac	
		accatttgca acagcttgat cggcaattgt	2940
		atctattggt tcacagagtt ggtgtggctc	
		tttactacta acgttgtgta atgctgctga	3000
		caaaaatfff gttaaaaagt ggacctcttc	
		ccccacaca taaaatctgg atttaaatc	3060
		tgacgcaaat cgccccacca cacttttcgg	
		actgatgaac ttgttaagca agccactcaa	3120
		atgagaatga aattccagca atacaaggac	
		ttctcaggg tcactatcaa ccagttcact	3180
		caatctccta tcaataaagg tgatctgatc	
		atcacttgat gtgtaagatt ctgggtctctc	3240
		acaaaaatg acaccgatac aataattaat	
		gaatctctca ctgattaagc cgtaaaagtc	3300
		agaggcatta tgaagattc cctgtcccat	
		gtcaatgaga ctgcttatat gggaaaggac	3360
		tattcctaat tcaaaatatt ctcgaaagat	
		tctttcagtc acagttgtct ctgaaccctc	3420
		aagaagtffc agctttgatt tgatatatga	
		tttcatcatt gcattcacia caggaaaagg	3480
		gacctcaaca agtttgtgca tgtgccaagt	
		taataagggtg ctgatatgat cctttccgga	3540
		acgcacatac tggctcatcac ccagtttgag	
		atfffgaagg agcattaaaa acaaaaatgg	3600
		gcacatcatt ggccccatt tgctatgatc	
		catactgtag ttcaacaacc cctctcgcac	3660
		attgatggtc attgatagaa ttgcattttc	
		aaattctttg tcattgttta agcatgaacc	3720
		tgagaagaag ctagaaaaag actcaaaaata	
		atctctatc aatcttgtaa acatfffctgt	3780
		tctcaaatcc ccaatataaa gttctctggt	
		tcctccaacc tgctctttgt atgataaccg	3840
		aaacttcaac cttccggaat caggaccaac	
		tgaagtgtat gacgttgggtg actcctctga	3900
		gtaaaaacat aaattcttta aagcagcact	
		catgcatttt gtcaatgata gagccttact	3960
		tagagactca gaattacttt ccctttcact	
		aattctaaca tcttcttcta gtttgcctca	4020
		gtcaacttg aaattcagac cttgtctttg	
		catgtgctg tatttccctg agtatgcatt	4080
		tgattcatt tgcagtagaa tcatfffctat	
		acacgaaaaac caatcaccct ctgaaaaaaa	4140
		cttctcagc aggttttttg coatfffctc	
		cagaccacat tgttctttga cagctgaagt	4200
		gaaatacaat ggtgacagtt ctgtagaagt	
		ttcaatagcc tcacagataa atttcatgct	4260
		atcattggtg agacaagatg ggtcaaaatc	
		ttccacaaga tgaaaagaaa tttctgataa	4320

ES 2 811 093 T3

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
		gatgaccttc cttaaatatg ccattttacc tgacaatata gtctgaaggt gatgcaatcc 4380 ttttgtatth tcaaacccca cctcattttc cccttcattg gtcttcttgc ttctttcata 4440 ccgctttatt gtggagttga cottatcttc taaattcttg aagaaacttg tctcttcttc 4500 cccatcaaag catatgtctg ctgagtcacc ttctagtthc ccagcttctg ttcttttaga 4560 gccgataacc aatctagaga ccaactttga aaccttgtag tctgtaactg agtggttcaa 4620 tttgtaactc tgctttctca tgaagctctc tgtgatctga ctcacagcac taacaagcaa 4680 tttgttaaaa tcatactcta ggagccgttc ccattttaaa tgtttgttaa caaccacact 4740 tttgttgctg gcaaggctca atgctgthgc acaccagag ttagtcatgg gatccaagct 4800 atgagcctc ttctcccctt tgaaaatcaa agtgccattg ttgaaatgagg acaccatcat 4860 gctaaaggcc tccagattga cactgggggt tgtgctctga cagtcaactt ctttcccagt 4920 gaacttcttc atttgggtcat aaaaaacaca ctcttctca ggggtgattg actctttagg 4980 gttaacaaaag aagccaaact cacttttagg ctcaaagaat ttctcaaagc atttaatttg 5040 atctgtcagc ctatcagggg ttctctttgt gattaaatga cacaggtatg acacattcaa 5100 catgaacttg aactttgctc tcaacagtac cttttcacca gtcccaaaaa cagttttgat 5160 caaaaatctg agcaatthgt acactacttt ctcagcaggt gtgatcaaat cctccttcaa 5220 cttgtccatc aatgatgtgg atgagaagtc tgagacaatg gccatcacta aatacctaht 5280 gttttgaacc tgtttttgat tctctthgt tgggttggtg agcatgagta ataatagggt 5340 tctcaatgca atctcaacat catcaatgct gtccttcaag tcaggacatg atctgatcca 5400 tgagatcatg gtgtcaatca tgttgtgcaa cacttcatct gagaagattg gtaaaaagaa 5460 cctttttggg tctgcataaa aagagattag atggccattg ggaccttgta tagaataaca 5520 ccttgaggat tctccagctt ttgatacag caggtgatat tctcagagt ccaatthtat 5580 cacttggaat aatacctctt tacattccac cacttgatac cttacagagc ccaatthggt 5640 ttgtcttaht ctagcaactg aactthgttt catactgtht gtcaaagcta gacagacaga 5700 tgacaatctt tcaaaactat gcatgthcct taattgthcc gtattaggct ggaaatcata 5760 atcttcaaac tthgtataat acattatagg atgagthccg gacctcatga aattctcaaa 5820 ctcaataaat ggtatgtggc actcatgctc aagatgthca gacagacct agtgcccaaa 5880 actaagthcc accactgaca agcacctthg aactthtaaa atgaactcat thatggatgt 5940 tctaaacaaa tctcaagag atacctthct atacgcctth gactthctcc tghtccttag 6000 aagthctgat aactthctc tggthctatg aaagctcacc aacctatcat tcacactccc 6060 atagcaacaa ccaaccagth gctthctatt 6120 thttgacct thgagthtag actgthtgat caacgaagag agacacaaga catccaaatt

ES 2 811 093 T3

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia	
		cagtaactgt ctccttctgg tgttcaataa 6180 ttttaactt ttaactttgt tcaacataga gaggagctc tcatactcag tgctagtctc 6240 acttcctctc tcataacat gggtatctgc tgtgataaat ctcatcaaag gacaggattc 6300 aactgcctcc ttgcttagtg ctgaaatgtc atcactgtca gcaagagtct cataaagctc 6360 agagaattcc ttaattaaat ttccggggtt gatthtctga aaactcctct tgagcttccc 6420 agttccaag tctcttctaa acctgctgta aaggagttt atgccaagaa ccacatcatc 6480 gcagttcatg tttgggttga caccatcatg gcacatthtc ataatttcat cattgtgaaa 6540 tgatcttgca tctttcaaga ttttcataga gtctataccg gaacgcttat caacagtggg 6600 cttgagagat tcgcaaagtc tgaagtactc agattcctca aagactttct catcttggct 6660 agaatactct aaaagtttaa acagaaggctc tctgaacttg aaattcaccct actctggcat 6720 aaagctgtta tcataatcac accgaccatc cactattggg accaatgtga taccgcgaat 6780 ggcaaggctc tctttgatac aggctagttt attgggtgctc tctataaatt tcttctcaa 6840 actagctggt gtgcttctaa cgaagcactc aagaagaatg agggaattgt caatcagttt 6900 ataacatca ggaatgatca aaggcagctc cgggcacaca atcccagact ctattagaat 6960 tgctcaaca gatthtcat catggttgtg tatgcagccg ctcttgctag cactgtctat 7020 ctctatacaa cgcgacaaaa gtttgagtcc ctctatcaat accattctgg gttctctttg 7080 ccctaaaaag ttgagcttct gccttgacaa cctctcatct tgttctatgt ggtttaagca 7140 caactctctc aactocgaaa tagcctcatc cattgcgcat caaaaagcct aggatcctcg 7200 gtgcg 7205	
5	Segmento S de la cepa MP de LCMV, secuencia completa. El segmento genómico es ARN, la secuencia en la SEQ ID NO: 5 se muestra para ADN; sin embargo, el intercambio de todas las timidinas ("T") en la SEQ ID NO: 5 por uridinas ("U") proporciona la secuencia de ARN.	cgcaöccgggg atcctaggct ttttgattg cgctttcctc agctccgtct tgtgggagaa 60 tgggtcaaat tgtgacgatg tttgaggctc tgctcacat cattgatgag gtcattaaca 120 ttgtcattat cgtgcttatt atcatcacga gcatcaaagc tgtgtacaat ttccccacct 180 gcgggatact tgcattgatc agctttcttt ttctggctgg caggctctgt ggaatgtatg 240 gtcttgatgg gcctgacatt tacaagggg ttaccgatt caagtcagtg gagtttgaca 300 tgtcttacct taacctgacg atgcccaatg catgttcggc aaacaactcc catcattata 360 taagtatggg gacttctgga ttggagttaa ccttcacaaa tgactccatc atcaccaca 420 acttttgtaa tctgacttcc gccctcaaca agaggacttt tgaccacaca cttatgagta 480 tagtctcaag tctgcacctc agcattagag ggtcccag ctacaaagca gtgtcctgtg 540 attttaacaa tggcatcact attcaataca acctgtcatt ttctaagca cagagcgctc 600 tgagtcaatg taagaccttc agggggagag tcttgatat gttcagaact gcttttgag 660 gaaagtacat gaggagtggc tgggctgga caggttcaga tggcaagact acttggtgca 720 gccagacaaa ctaccaatat ctqattatac	

ES 2 811 093 T3

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia	
		aaaacaggac ttgggaaaac cactgcaggt 780	
		acgcaggccc tttcggaatg tctagaattc 840	
		tcttcgctca agaaaagaca aggtttctaa 840	
		ctagaaggct tgcaggcaca ttcaacttga 900	
		ctttatcaga ctcatcagga gtggagaatc 900	
		caggtggtta ctgcttgacc aagtggatga 960	
		tcttcgctgc agagctcaag tgttttggga 960	
		acacagctgt tgcaaagtgc aatgtaaactc 1020	
		atgatgaaga gttctgtgat atgctacgac 1020	
		tgattgatta caacaaggct gctttgagta 1080	
		aattcaaaga agatgtagaa tccgctctac 1080	
		atctgttcaa gacaacagtg aattctttga 1140	
		tttctgatca gcttttgatg agaaatcacc 1140	
		taagagactt gatgggagtg ccatactgca 1200	
		attactcgaa attctggtat ctagagcatg 1200	
		caaagactgg tgagactagt gtccccaagt 1260	
		gctggcttgt cagcaatggt tcttatttga 1260	
		atgaaaccca tttcagcgac caaattgagc 1320	
		aggaagcaga taatatgac acagaaatgc 1320	
		tgagaaagga ctacataaaa aggcaagggga 1380	
		gtacccctct agccttgatg gatctattga 1380	
		tgttttctac atcagcatat ttgatcagca 1440	
		tctttctgca tcttgtaggg ataccaacac 1440	
		acagacacat aaagggcggc tcatgcccac 1500	
		aaccacatcg gtttaaccagc aaggggaatct 1500	
		gtagttgtgg tgcatttaaa gtaccaggtg 1560	
		tggaaacacc ctggaaaaga cgctgaacag 1560	
		cagcgctcc ctgactcacc acctcgaaag 1620	
		aggtggtgag tcagggaggc ccagagggtc 1620	
		ttagagtggt acgacatttg gacctctgaa 1680	
		gattaggtca tgtggtagga tattgtggac 1680	
		agttttcagg tcggggagcc ttgccttggga 1740	
		ggcgctttca aagatgatac agtccatgag 1740	
		tgcacagtgt ggggtgacct cttctttttt 1800	
		cttgtccctc actattccag tgtgcatctt 1800	
		gcatagccag ccatatttgt ccagactttt 1860	
		gtcctcatat tctcttgaag cttcttttagt 1860	
		catctcaaca tcgatgagct taatgtctct 1920	
		tctgttttgt gaatctagga gtttctgat 1920	
		gtcatcagat ccctgacaac ttaggaccat 1980	
		tcctgtgga agagcaccta ttagtgaaga 1980	
		tgtcagccca ggttgtgcat tgaagaggtc 2040	
		agcaaggctc atgccatgtg agtatttggga 2040	
		gtcctgcttg aattgttttt gatcagtggg 2100	
		ttctctatag aaatgtatgt actgccatt 2100	
		ctgtggctga aatattgcta tttctaccgg 2160	
		gtcattaat ctgccctcaa tgtcaatcca 2160	
		tgtaggagcg ttagggctcaa tacctcccac 2220	
		gaggtccttc agcaacattg tttggctgta 2220	
		gcttaagccc acctgaggtg ggcccgctgc 2280	
		ccagggcgt ggtttgggtg agttggccat 2280	
		aggcctctca tttgtcagat caattgttgt 2340	
		gttctcccat gctctcccta caactgatgt 2340	
		tctacaagct atgtatggcc acccctcccc 2400	
		tgaagacag actttgtaga ggatgttctc 2400	
		gtaaggattc ctgtctccaa cctgatcaga 2460	
		aacaaacatg ttgagtttct tcttggcccc 2460	
		aagaactgct ttcaggagat cctcactggt 2520	
		gcttggttca attaagatgg attccaacat 2520	
		gttaccceca tctaacaagg ctgccctgc 2580	
		tttcacagca qcaccgagac tgaatttga 2580	

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
		gccagatatg ttgatgctag actgctgctc agtgatgact cccaagactg ggtgcttgct 2640 ttccagcctt tcaaggtcac ttaggttcgg gtacttgact gtgtaaagca gcccaaggtc 2700 tgtgagtgtc tgcacaacgt cattgagtga ggtttgatgat tgtttggcca tacaagccat 2760 tgtaagcctt ggcattgtgc cgaattgatt gttcagaagt gatgagtcct tcacatccca 2820 gaccctcacc acaccatttg cactctgctg aggtctcctc attccaacca tttgcagaat 2880 ctgagatcct tggtaagct gttgtgctgt taagttcccc atgtagactc cagaagttag 2940 aggctttca gacctcatga ttttagcctt cagtttttca aggtcagctg caagggacat 3000 cagtctctct gcactaagcc tccctacttt tagaacattc ttttttgatg ttgactttag 3060 gtccacaagg gaatacacag tttggttgag gcttctgagt ctctgtaaat ctttgtcatc 3120 cctcttctct ttctctcatga tcctctgaac attgctcacc tcagagaagt ctaatccatt 3180 cagaaggctg gtggcatcct tgatcacagc agctttcaca tctgatgtga agccttgaag 3240 ctctctctc aatgcctggg tccattgaaa gcttttaact tctttggaca gagacatttt 3300 gtcactcagt ggatttccaa gtcaaatgcg caatcaaaat gcctaaggatc cactgtgcg 3359
6	Secuencia de aminoácidos de la proteína NP de la cepa MP de LCMV.	Met Ser Leu Ser Lys Glu Val Lys Ser Phe Gln Trp Thr Gln Ala Leu Arg Arg Glu Leu Gln Gly Phe Thr Ser Asp Val Lys Ala Ala Val Ile Lys Asp Ala Thr Ser Leu Leu Asn Gly Leu Asp Phe Ser Glu Val Ser Asn Val Gln Arg Ile Met Arg Lys Glu Lys Arg Asp Asp Lys Asp Leu Gln Arg Leu Arg Ser Leu Asn Gln Thr Val Tyr Ser Leu Val Asp Leu Lys Ser Thr Ser Lys Lys Asn Val Leu Lys Val Gly Arg Leu Ser Ala Glu Glu Leu Met Ser Leu Ala Ala Asp Leu Glu Lys Leu Lys Ala Lys Ile Met Arg Ser Glu Arg Pro Leu Thr Ser Gly Val Tyr Met Gly Asn Leu Thr Ala Gln Gln Leu Asp Gln Arg Ser Gln Ile Leu Gln Met Val Gly Met Arg Arg Pro Gln Gln Ser Ala Asn Gly Val Val Arg Val Trp Asp Val Lys Asp Ser Ser Leu Leu Asn Asn Gln Phe Gly Thr Met Pro Ser Leu Thr Met Ala Cys Met Ala Lys Gln Ser Gln Thr Ser Leu Asn Asp Val Val Gln Ala Leu Thr Asp Leu Gly Leu Leu Tyr Thr Val Lys Tyr Pro Asn Leu Ser Asp Leu Glu Arg Leu Lys Asp Lys His Pro Val Leu Gly Val Ile Thr Glu Gln Gln Ser Ser Ile Asn Ile Ser Gly Tyr Asn Phe Ser Leu Gly Ala Ala Val Lys Ala Gly Ala Ala Leu Leu Asp Gly Gly Asn Met Leu Glu Ser Ile Leu Ile Lys Pro Ser Asn Ser Glu Asp Leu Leu Lys Ala Val Leu Gly Ala Lys Lys Lys Leu Asn Met Phe Asp Arg Asn Pro Tyr Glu Asn Ile Leu Tyr Lys Val Cys Leu Ser Gly Glu Gly Trp Pro Tyr Ile Ala Cys Arg Thr Ser Val Val Gly Arg Ala Trp Glu Asn Thr Thr Ile Asp Leu Thr Asn Glu Arg Pro Met Ala Asn Ser Pro Lys Pro Ala Pro Gly Ala Ala Gly Pro Pro Gln Val

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
		Gly Leu Ser Tyr Ser Gln Thr Met Leu Leu Lys Asp Leu Met Gly Gly Ile Asp Pro Asn Ala Pro Thr Trp Ile Asp Ile Glu Gly Arg Phe Asn Asp Pro Val Glu Ile Ala Ile Phe Gln Pro Gln Asn Gly Gln Tyr Ile His Phe Tyr Arg Glu Pro Thr Asp Gln Lys Gln Phe Lys Gln Asp Ser Lys Tyr Ser His Gly Met Asp Leu Ala Asp Leu Phe Asn Ala Gln Pro Gly Leu Thr Ser Ser Val Ile Gly Ala Leu Pro Gln Gly Met Val Leu Ser Cys Gln Gly Ser Asp Asp Ile Arg Lys Leu Leu Asp Ser Gln Asn Arg Arg Asp Ile Lys Leu Ile Asp Val Glu Met Thr Lys Glu Ala Ser Arg Glu Tyr Glu Asp Lys Val Trp Asp Lys Tyr Gly Trp Leu Cys Lys Met His Thr Gly Ile Val Arg Asp Lys Lys Lys Lys Glu Val Thr Pro His Cys Ala Leu Met Asp Cys Ile Ile Phe Glu Ser Ala Ser Lys Ala Arg Leu Pro Asp Leu Lys Thr Val His Asn Ile Leu Pro His Asp Leu Ile Phe Arg Gly Pro Asn Val Val Thr Leu
7	Secuencia de aminoácidos de la proteína GP de la cepa MP de LCMV.	Met Gly Gln Ile Val Thr Met Phe Glu Ala Leu Pro His Ile Ile Asp Glu Val Ile Asn Ile Val Ile Ile Val Leu Ile Ile Ile Thr Ser Ile Lys Ala Val Tyr Asn Phe Ala Thr Cys Gly Ile Leu Ala Leu Ile Ser Phe Leu Phe Leu Ala Gly Arg Ser Cys Gly Met Tyr Gly Leu Asp Gly Pro Asp Ile Tyr Lys Gly Val Tyr Arg Phe Lys Ser Val Glu Phe Asp Met Ser Tyr Leu Asn Leu Thr Met Pro Asn Ala Cys Ser Ala Asn Asn Ser His His Tyr Ile Ser Met Gly Thr Ser Gly Leu Glu Leu Thr Phe Thr Asn Asp Ser Ile Ile Thr His Asn Phe Cys Asn Leu Thr Ser Ala Leu Asn Lys Arg Thr Phe Asp His Thr Leu Met Ser Ile Val Ser Ser Leu His Leu Ser Ile Arg Gly Val Pro Ser Tyr Lys Ala Val Ser Cys Asp Phe Asn Asn Gly Ile Thr Ile Gln Tyr Asn Leu Ser Phe Ser Asn Ala Gln Ser Ala Leu Ser Gln Cys Lys Thr Phe Arg Gly Arg Val Leu Asp Met Phe Arg Thr Ala Phe Gly Gly Lys Tyr Met Arg Ser Gly Trp Gly Trp Thr Gly Ser Asp Gly Lys Thr Thr Trp Cys Ser Gln Thr Asn Tyr Gln Tyr Leu Ile Ile Gln Asn Arg Thr Trp Glu Asn His Cys Arg Tyr Ala Gly Pro Phe Gly Met Ser Arg Ile Leu Phe Ala Gln Glu Lys Thr Arg Phe Leu Thr Arg Arg Leu Ala Gly Thr Phe Thr Trp Thr Leu Ser Asp Ser Ser Gly Val Glu Asn Pro Gly Gly Tyr Cys Leu Thr Lys Trp Met Ile Leu Ala Ala Glu Leu Lys Cys Phe Gly Asn Thr Ala Val Ala Lys Cys Asn Val Asn His Asp Glu Glu Phe Cys Asp Met Leu Arg Leu Ile Asp Tyr Asn Lys Ala Ala Leu Ser Lys Phe Lys Glu Asp Val Glu Ser Ala Leu His Leu Phe Lys Thr Thr Val Asn Ser Leu Ile Ser Asp Gln Leu Leu Met Arg Asn His Leu Arg Asp Leu Met Gly Val Pro Tyr Cys Asn Tyr Ser Lys Phe Trp Tyr Leu Glu His Ala Lys Thr Gly Glu Thr Ser Val Pro Lys

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
		Cys Trp Leu Val Ser Asn Gly Ser Tyr Leu Asn Glu Thr His Phe Ser Asp Gln Ile Glu Gln Glu Ala Asp Asn Met Ile Thr Glu Met Leu Arg Lys Asp Tyr Ile Lys Arg Gln Gly Ser Thr Pro Leu Ala Leu Met Asp Leu Leu Met Phe Ser Thr Ser Ala Tyr Leu Ile Ser Ile Phe Leu His Leu Val Arg Ile Pro Thr His Arg His Ile Lys Gly Gly Ser Cys Pro Lys Pro His Arg Leu Thr Ser Lys Gly Ile Cys Ser Cys Gly Ala Phe Lys Val Pro Gly Val Glu Thr Thr Trp Lys Arg Arg
8	Secuencia de aminoácidos de la proteína L de la cepa MP de LCMV.	Met Asp Glu Ala Ile Ser Glu Leu Arg Glu Leu Cys Leu Asn His Ile Glu Gln Asp Glu Arg Leu Ser Arg Gln Lys Leu Asn Phe Leu Gly Gln Arg Glu Pro Arg Met Val Leu Ile Glu Gly Leu Lys Leu Leu Ser Arg Cys Ile Glu Ile Asp Ser Ala Asp Lys Ser Gly Cys Ile His Asn His Asp Asp Lys Ser Val Glu Ala Ile Leu Ile Glu Ser Gly Ile Val Cys Pro Gly Leu Pro Leu Ile Ile Pro Asp Gly Tyr Lys Leu Ile Asp Asn Ser Leu Ile Leu Leu Glu Cys Phe Val Arg Ser Thr Pro Ala Ser Phe Glu Lys Lys Phe Ile Glu Asp Thr Asn Lys Leu Ala Cys Ile Lys Glu Asp Leu Ala Ile Ala Gly Ile Thr Leu Val Pro Ile Val Asp Gly Arg Cys Asp Tyr Asp Asn Ser Phe Met Pro Glu Trp Val Asn Phe Lys Phe Arg Asp Leu Leu Phe Lys Leu Leu Glu Tyr Ser Ser Gln Asp Glu Lys Val Phe Glu Glu Ser Glu Tyr Phe Arg Leu Cys Glu Ser Leu Lys Thr Thr Val Asp Lys Arg Ser Gly Ile Asp Ser Met Lys Ile Leu Lys Asp Ala Arg Ser Phe His Asn Asp Glu Ile Met Lys Met Cys His Asp Gly Val Asn Pro Asn Met Asn Cys Asp Asp Val Val Leu Gly Ile Asn Ser Leu Tyr Ser Arg Phe Arg Arg Asp Leu Glu Thr Gly Lys Leu Lys Arg Ser Phe Gln Lys Ile Asn Pro Gly Asn Leu Ile Lys Glu Phe Ser Glu Leu Tyr Glu Thr Leu Ala Asp Ser Asp Asp Ile Ser Ala Leu Ser Lys Glu Ala Val Glu Ser Cys Pro Leu Met Arg Phe Ile Thr Ala Asp Thr His Gly Tyr Glu Arg Gly Ser Glu Thr Ser Thr Glu Tyr Glu Arg Leu Leu Ser Met Leu Asn Lys Val Lys Ser Leu Lys Leu Leu Asn Thr Arg Arg Arg Gln Leu Leu Asn Leu Asp Val Leu Cys Leu Ser Ser Leu Ile Lys Gln Ser Lys Leu Lys Gly Ser Lys Asn Asp Lys His Trp Val Gly Cys Cys Tyr Gly Ser Val Asn Asp Arg Leu Val Ser Phe His Ser Thr Lys Glu Glu Phe Ile Arg Leu Leu Arg Asn Arg Arg Lys Ser Lys Ala Tyr Arg Lys Val Ser Leu Glu Asp Leu Phe Arg Thr Ser Ile Asn Glu Phe Ile Leu Lys Val Gln Arg Cys Leu Ser Val Val Gly Leu Ser Phe Gly His Tyr Gly Leu Ser Glu His Leu Glu His Glu Cys His Ile Pro Phe Ile Glu Phe Glu Asn Phe Met Arg Ser Gly Thr His Pro Ile Met Tyr Tyr Thr Lys Phe Glu Asp Tyr Asp Phe Gln Pro Asn Thr Glu Gln Leu Arg Asn Met His Ser Leu Lys Arg Leu

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
		Ser Ser Val Cys Leu Ala Leu Thr Asn Ser Met Lys Thr Ser Ser Val Ala Arg Leu Arg Gln Asn Gln Leu Gly Ser Val Arg Tyr Gln Val Val Glu Cys Lys Glu Val Phe Cys Gln Val Ile Lys Leu Asp Ser Glu Glu Tyr His Leu Leu Tyr Gln Lys Thr Gly Glu Ser Ser Arg Cys Tyr Ser Ile Gln Gly Pro Asn Gly His Leu Ile Ser Phe Tyr Ala Asp Pro Lys Arg Phe Phe Leu Pro Ile Phe Ser Asp Glu Val Leu His Asn Met Ile Asp Thr Met Ile Ser Trp Ile Arg Ser Cys Pro Asp Leu Lys Asp Ser Ile Asp Asp Val Glu Ile Ala Leu Arg Thr Leu Leu Leu Leu Met Leu Thr Asn Pro Thr Lys Arg Asn Gln Lys Gln Val Gln Asn Ile Arg Tyr Leu Val Met Ala Ile Val Ser Asp Phe Ser Ser Thr Ser Leu Met Asp Lys Leu Lys Glu Asp Leu Ile Thr Pro Ala Glu Lys Val Val Tyr Lys Leu Leu Arg Phe Leu Ile Lys Thr Val Phe Gly Thr Gly Glu Lys Val Leu Leu Ser Ala Lys Phe Lys Phe Met Leu Asn Val Ser Tyr Leu Cys His Leu Ile Thr Lys Glu Thr Pro Asp Arg Leu Thr Asp Gln Ile Lys Cys Phe Glu Lys Phe Phe Glu Pro Lys Ser Glu Phe Gly Phe Phe Val Asn Pro Lys Glu Ser Ile Thr Pro Glu Glu Glu Cys Val Phe Tyr Asp Gln Met Lys Lys Phe Thr Gly Lys Glu Val Asp Cys Gln Arg Thr Thr Pro Gly Val Asn Leu Glu Met Met Val Ser Ser Phe Asn Asn Gly Thr Leu Ile Phe Lys Arg Leu Asn Ser Leu Asp Pro Met Thr Asn Ser Gly Cys Ala Thr Ala Leu Asp Leu Ala Ser Asn Lys Ser Val Val Val Asn Lys His Leu Asn Gly Glu Arg Leu Leu Glu Tyr Asp Phe Asn Lys Leu Leu Val Ser Ala Val Ser Gln Ile Thr Glu Ser Phe Met Arg Lys Gln Lys Tyr Lys Leu Asn His Ser Asp Tyr Glu Tyr Lys Val Ser Lys Leu Val Ser Arg Leu Val Ile Gly Ser Lys Glu Thr Glu Ala Gly Lys Leu Glu Gly Asp Ser Ala Asp Ile Cys Phe Asp Gly Glu Glu Glu Thr Ser Phe Phe Lys Asn Leu Glu Asp Lys Val Asn Ser Thr Ile Lys Arg Tyr Glu Arg Ser Lys Lys Thr Asn Glu Gly Glu Asn Glu Val Gly Phe Glu Asn Thr Lys Gly Leu His His Leu Gln Thr Ile Leu Ser Gly Lys Met Ala Tyr Leu Arg Lys Val Ile Leu Ser Glu Ile Ser Phe His Leu Val Glu Asp Phe Asp Pro Ser Cys Leu Thr Asn Asp Asp Met Lys Phe Ile Cys Glu Ala Ile Glu Thr Ser Thr Glu Leu Ser Pro Leu Tyr Phe Thr Ser Ala Val Lys Glu Gln Cys Gly Leu Asp Glu Met Ala Lys Asn Leu Cys Arg Lys Phe Phe Ser Glu Gly Asp Trp Phe Ser Cys Met Lys Met Ile Leu Leu Gln Met Asn Ala Asn Ala Tyr Ser Gly Lys Tyr Arg His Met Gln Arg Gln Gly Leu Asn Phe Lys Phe Asp Trp Asp Lys Leu Glu Glu Asp Val Arg Ile Ser Glu Arg Glu Ser Asn Ser Glu Ser Leu Ser Lys Ala Leu Ser Leu Thr Lys Cys Met Ser Ala Ala Leu Lys Asn Leu Cys Phe Tyr Ser Glu Glu Ser Pro Thr Ser Tyr Thr Ser Val Gly Pro Asp Ser

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
		Gly Arg Leu Lys Phe Ala Leu Ser Tyr Lys Glu Gln Val Gly Gly Asn Arg Glu Leu Tyr Ile Gly Asp Leu Arg Thr Lys Met Phe Thr Arg Leu Ile Glu Asp Tyr Phe Glu Ser Phe Ser Ser Phe Phe Ser Gly Ser Cys Leu Asn Asn Asp Lys Glu Phe Glu Asn Ala Ile Leu Ser Met Thr Ile Asn Val Arg Glu Gly Leu Leu Asn Tyr Ser Met Asp His Ser Lys Trp Gly Pro Met Met Cys Pro Phe Leu Phe Leu Met Leu Leu Gln Asn Leu Lys Asp Asp Gln Tyr Val Arg Ser Gly Lys Asp His Ile Ser Thr Leu Leu Thr Trp His Met His Lys Leu Val Glu Val Pro Phe Pro Val Val Asn Ala Met Met Lys Ser Tyr Ile Lys Ser Lys Leu Lys Leu Leu Arg Gly Ser Glu Thr Thr Val Thr Glu Arg Ile Phe Arg Glu Tyr Phe Glu Leu Gly Ile Val Pro Ser His Ile Ser Ser Leu Ile Asp Met Gly Gln Gly Ile Leu His Asn Ala Ser Asp Phe Tyr Gly Leu Ile Ser Glu Arg Phe Ile Asn Tyr Cys Ile Gly Val Ile Phe Gly Glu Arg Pro Glu Ser Tyr Thr Ser Ser Asp Asp Gln Ile Thr Leu Phe Asp Arg Arg Leu Ser Glu Leu Val Asp Ser Asp Pro Glu Glu Val Leu Val Leu Leu Glu Phe His Ser His Leu Ser Gly Leu Leu Asn Lys Phe Ile Ser Pro Lys Ser Val Val Gly Arg Phe Ala Ala Glu Phe Lys Ser Arg Phe Tyr Val Trp Gly Glu Glu Val Pro Leu Leu Thr Lys Phe Val Ser Ala Ala Leu His Asn Val Lys Cys Lys Glu Pro His Gln Leu Cys Glu Thr Ile Asp Thr Ile Ala Asp Gln Ala Val Ala Asn Gly Val Pro Val Ser Leu Val Asn Cys Ile Gln Lys Arg Thr Leu Asp Leu Leu Lys Tyr Ala Asn Phe Pro Leu Asp Pro Phe Leu Leu Asn Thr Asn Thr Asp Val Lys Asp Trp Leu Asp Gly Ser Arg Gly Tyr Arg Ile Gln Arg Leu Ile Glu Glu Leu Cys Pro Ser Glu Thr Lys Val Met Arg Arg Leu Val Arg Arg Leu His His Lys Leu Lys Asn Gly Glu Phe Asn Glu Glu Phe Phe Leu Asp Leu Phe Asn Arg Asp Lys Lys Glu Ala Ile Leu Gln Leu Gly Asn Ile Leu Gly Leu Glu Glu Asp Leu Ser Gln Leu Ala Asn Ile Asn Trp Leu Asn Leu Asn Glu Leu Phe Pro Leu Arg Met Val Leu Arg Gln Lys Val Val Tyr Pro Ser Val Met Thr Phe Gln Glu Glu Arg Ile Pro Ser Leu Ile Lys Thr Leu Gln Asn Lys Leu Cys Ser Lys Phe Thr Arg Gly Ala Gln Lys Leu Leu Ser Glu Ala Ile Asn Lys Ser Ala Phe Gln Ser Cys Ile Ser Ser Gly Phe Ile Gly Leu Cys Lys Thr Leu Gly Ser Arg Cys Val Arg Asn Lys Asn Arg Asp Asn Leu Tyr Ile Arg Lys Val Leu Glu Asp Leu Ala Met Asp Ala His Val Thr Ala Ile His Arg His Asp Gly Ile Met Leu Tyr Ile Cys Asp Arg Gln Ser His Pro Glu Ala His Cys Asp His Ile Ser Leu Leu Arg Pro Leu Leu Trp Asp Tyr Ile Cys Ile Ser Leu Ser Asn Ser Phe Glu Leu Gly Val Trp Val Leu Ala Glu Pro Val Lys Gly Lys Asn Glu Gly Ser Ser Ser Leu Lys His Leu Asn Pro Cys Asp Tyr Val

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
		Ala Arg Lys Pro Glu Ser Ser Arg Leu Leu Glu Asp Lys Ile Ser Leu Asn His Val Ile Gln Ser Val Arg Arg Leu Tyr Pro Lys Ile Tyr Glu Asp Gln Leu Leu Pro Phe Met Ser Asp Met Ser Ser Lys Asn Met Arg Trp Ser Pro Arg Ile Lys Phe Leu Asp Leu Cys Val Leu Ile Asp Ile Asn Ser Glu Ser Leu Ser Leu Ile Ser His Val Val Lys Trp Lys Arg Asp Glu His Tyr Thr Val Leu Phe Ser Asp Leu Val Asn Ser His Gln Arg Ser Asp Ser Ser Leu Val Asp Glu Phe Val Val Ser Thr Arg Asp Val Cys Lys Asn Phe Leu Lys Gln Val Tyr Phe Glu Ser Phe Val Arg Glu Phe Val Ala Thr Ser Arg Thr Leu Gly Ser Phe Ser Trp Phe Pro His Lys Asp Met Met Pro Ser Glu Asp Gly Ala Glu Ala Leu Gly Pro Phe Gln Ser Phe Ile Leu Lys Val Val Asn Lys Asn Met Glu Arg Pro Met Phe Arg Asn Asp Leu Gln Phe Gly Phe Gly Trp Phe Ser Tyr Arg Leu Gly Asp Ile Val Cys Asn Ala Ala Met Leu Ile Lys Gln Gly Leu Thr Asn Pro Lys Ala Phe Lys Ser Leu Arg Asn Leu Trp Asp Tyr Met Ile Asn Asn Thr Glu Gly Val Leu Glu Phe Ser Ile Thr Val Asp Phe Thr His Asn Gln Asn Asn Thr Asp Cys Leu Arg Lys Phe Ser Leu Ile Phe Leu Val Lys Cys Gln Leu Gln Gly Pro Gly Val Ala Glu Phe Leu Ser Cys Ser His Leu Phe Lys Gly Glu Val Asp Arg Arg Phe Leu Asp Glu Cys Leu His Leu Leu Arg Ser Asp Ser Ile Phe Lys Val Asn Asp Gly Val Phe Asp Ile Arg Ser Glu Glu Phe Glu Asp Tyr Met Glu Asp Pro Leu Ile Leu Gly Asp Ser Leu Glu Leu Glu Leu Ile Gly Ser Arg Lys Ile Leu Asp Gly Ile Arg Ser Leu Asp Phe Glu Arg Ile Gly Pro Glu Trp Glu Pro Val Pro Leu Thr Val Arg Met Gly Ala Leu Phe Glu Gly Arg Ser Leu Val Gln Asn Ile Val Val Lys Leu Glu Thr Lys Asp Met Arg Val Phe Leu Ala Glu Leu Glu Gly Tyr Gly Asn Phe Asp Asp Val Leu Gly Ser Leu Leu Leu His Arg Phe Arg Thr Gly Glu His Leu Gln Gly Ser Glu Ile Ser Thr Ile Leu Gln Glu Leu Cys Ile Asp Arg Ser Ile Leu Leu Val Pro Leu Ser Leu Val Pro Asp Trp Phe Thr Phe Lys Asp Cys Arg Leu Cys Phe Ser Lys Ser Lys Asn Thr Val Met Tyr Glu Thr Val Val Gly Lys Tyr Arg Leu Lys Gly Lys Ser Cys Asp Asp Trp Leu Thr Lys Ser Val Val Glu Glu Ile Asp
9	secuencia de aminoácidos de la proteína Z de la cepa MP de LCMV.	Met Gly Gln Gly Lys Ser Lys Glu Gly Arg Asp Ala Ser Asn Thr Ser Arg Ala Glu Ile Leu Pro Asp Thr Thr Tyr Leu Gly Pro Leu Asn Cys Lys Ser Cys Trp Gln Arg Phe Asp Ser Leu Val Arg Cys His Asp His Tyr Leu Cys Arg His Cys Leu Asn Leu Leu Leu Ser Val Ser Asp Arg Cys Pro Leu Cys Lys His Pro Leu Pro Thr Lys Leu Lys Ile Ser Thr Ala Pro Ser Ser Pro Pro Pro Tyr Glu Glu

ES 2 811 093 T3

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
10	Segmento S del Clon 13 de LCMV que codifica gB de la cepa de HCMV Merlin; tipo salvaje de longitud completa. El segmento genómico es ARN, la secuencia en la SEQ ID No. 10 se muestra para ADN; sin embargo, el intercambio de todas las timidinas ("T") en la SEQ ID NO: 10 por uridinas ("U") proporciona la secuencia de ARN.	<p>gcgcaaccggg gatcctaggc tttttggatt gcgcttttccct ctatagatcaac tgggtgtcag 60 gccttatccct acagaaggat ggaatccagg atctgggtgcc tggtagtctg cgtaacttg 120 tgtatcgtct gtctgggtgc tgcggtttcc tcatcttcta ctctggaac ttctgctact 180 cacagtcacc attcctctca tacgacgtct gctgctcact ctcgatccgg ttcagtctct 240 caacgcgtaa cttcttccca aacggtcagc catgggtgta acgagacat ctacaacact 300 accctcaagt acggagatgt ggtgggggtc aataccacca agtacccta tcgctgtgtg 360 tctatggccc aggttacgga tcttattcgc tttgaacgta atatcgtctg cacctcgatg 420 aagcccataca atgaagacct ggacgagggc atcatgggtgg tctacaaaacg caacatcgtc 480 gcgcacacct ttaaggtacg agtctaccag aaggttttga cgtttcgtcg tagctacgct 540 tacatccaca ccacttatct gctgggcagc aacacggaat acgtggcgcc tctatgtgg 600 gagattcatc atatcaacag ccacagtcag tgctacagtt cctacagccg cgttatagca 660 ggcaacggttt tcgtggctta tcatagggac agctatgaaa acaaaaacct gcaattaatg 720 ccgacgatt attccaacac ccacagtacc cgttacgtga cggtaagga tcaatggcac 780 agccgcggca gcaactggct ctatcgtgag acctgtaatc tgaattgtat ggtgaccatc 840 actactgcgc gctccaaaata tcttatcat tttttcgcca ctccacggg tgacgtggtt 900 gacatttctc ctttctacaa cggaaccaat cgcaatgccca gctactttgg agaaaacgcc 960 gacaagtttt tcatttttcc gaactacact atgtctccg actttggaag accgaattct 1020 gcgttagaga cccacaggtt ggtggctttt cttgaacgtg cggactcggg gatctcctgg 1080 gatatacagg acgaaaagaa tgtcacttgt caactcactt tctgggaagc ctcggaaccg 1140 accattcgtt ccgaagccga ggactcgtat cacttttctt ctgccccaaat gaccgccact 1200 ttcttatcta agaagcaaga ggtgaacatg tccgactctg cgctggactg cgtacgtgat 1260 gaggctataa ataagttaca gcagattttc aatacttcat acaatcaaac atatgaaaaa 1320 tatggaaacg tgtcgtctt tgaaaccact ggtggtttgg tagtgttctg gcaaggtatc 1380 aagcaaaaat ctctgggtgga actcgaacgt ttggccaacc gctccagtct gaatcttact 1440 cataatagaa ccaaaaagaag tacagatggc aacaatgcaa ctcatttatc caacatggaa 1500 tcggtgcaca atctggtcta cgcccagctg cagttcacct atgacacgtt gcgcggttac 1560 atcaaccggg cgctggcgca aatcgcagaa gcctggtgtg tggatcaacg gcgcacccta 1620 gaggtcttca aggaactcag caagatcaac cgtcagcca ttctctcggc catttacaac 1680 aaaccgattg ccgcgcggtt catgggtgat gtcttgggcc tggccagctg cgtgaccatc 1740 aaccaaaacca gcgtcaaggt gctgcgtgat atgaacgtga aggagtcgcc aggacgctgc 1800 tactcacgac ccqgtgctcat ctttaatttc</p>

ES 2 811 093 T3

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia	
		gccaacagct cgtacgtgca gtacgggtcaa	1860
		ctggggcgagg acaacgaaat cctggtgggc	
		aaccaccgca ctgaggaatg tcagcttccc	1920
		agcctcaaga tcttcatcgc cggaactcg	
		gcctacgagt acgtggacta cctcttcaaa	1980
		cgcatgattg acctcagcag tatctccacc	
		gtcgacagca tgatcgccct ggatategac	2040
		ccgctggaaa ataccgactt cagggactg	
		gaactttact cgcagaaaga gctgcgttcc	2100
		agcaacgttt ttgacctcga agagatcatg	
		cgcaattca actcgtacaa gcagcgggta	2160
		aagtacgtgg aggacaaggt agtcgaccg	
		ctaccgccct acctcaaggg tctggacgac	2220
		ctcatgagcg gcctggggcg cgcgggaaag	
		gccgttggcg tagccattgg gcccggtgggt	2280
		ggcgcggtgg cctccgtggt cgaaggcggt	
		gccaccttcc tcaaaaaccc cttcggagcg	2340
		ttaccatca tccctcgtggc catagctgta	
		gtcattatca cttatttgat ctatactcga	2400
		cagcggcggt tgtgcacgca gccgctgcag	
		aacctctttc cctatctggt gtccgccgac	2460
		gggaccaccg tgacgtcggg cagcaccaaa	
		gacacgtcgt tacaggctcc gccttcctac	2520
		gaggaaagtg tttataattc tggctgcaaa	
		ggaccgggac caccgctcgtc tgatgcatcc	2580
		acggcggctc cgccttacac caacgagcag	
		gcttaccaga tgcttctggc cctggcccgt	2640
		ctggacgcag agcagcggagc gcagcagaac	
		ggtacagatt ctttggacgg accggactggc	2700
		acgcaggaca agggacagaa gcccaccta	
		ctagaccgac tgcgacatcg caaaaacggc	2760
		taccgacact tgaaagactc tgacgaagaa	
		gagaacgtct gaagaacagc gcctccctga	2820
		ctctccacct cgaaagaggt ggagagtcag	
		ggaggcccag agggctcttag agtgtcacia	2880
		catctgggccc tctaaaaatt aggtcatgtg	
		gcagaatggt gtgaacagtt ttcagatctg	2940
		ggagccttgc tttggaggcg ctttcaaaaa	
		tgatgcagtc catgagtgca cagtgcgggg	3000
		tgatctcttt cttctttttg tcccttacta	
		ttccagtatg catcttacac aaccagccat	3060
		atctgtccca cactttatct tcatactccc	
		tcgaagcttc cctggtcatt tcaacatcga	3120
		taagcttaat gtccttcccta ttttgtgagt	
		ccagaagctt tctgatgtca tccggaccctt	3180
		gacagcttag aaccatcccc tgcggaagag	
		cacctataac tgaccgaggtc aaccggggtt	3240
		gcgattgaa gaggtcggca agatccatgc	
		cgtgtgagta cttggaatct tgcttgaatt	3300
		gtttttgatc aacgggttcc ctgtaaaagt	
		gtatgaactg cccgttctgt ggttggaaaa	3360
		ttgctatttc cactggatca ttaaatctac	
		cctcaatgtc aatccatgta ggagcgttgg	3420
		ggtcaattcc tcccatgagg tcttttaaaa	
		gcattgtctg gctgtagctt aagcccacct	3480
		gaggtggacc tgctgctcca ggcgctggcc	
		tgggtgagtt gactgcaggt ttctcgcttg	3540
		tgagatcaat tgttgtgttt tcccatgctc	
		tccccacaat cgatgttcta caagctatgt	3600
		atggccatcc ttcacctgaa aggcaaacctt	
		tatagaggat gttttcataa gggttcctgt	3660

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
		<pre> ccccaaacttg gtctgaaaca aacatggtga gttttctctt ggccccgaga actgccttca 3720 agagatcctc gctgttgctt ggcttgatca aaattgactc taacatgtta cccccatcca 3780 acagggctgc ccctgccttc acggcagcac caagactaaa gttatagcca gaaatggtga 3840 tgctggactg ctgttcagtg atgacccccca gaactgggtg cttgtctttc agcctttcaa 3900 gatcattaag atttggatac ttgactgtgt aaagcaagcc aaggctctgtg agcgcttgta 3960 caacgtcatt gagcggagtc tgtgactggt tggccataca agccatagtt agacttggca 4020 ttgtgcaaaa ttgattgttc aaaagtgatg agtctttcac atcccaaact cttaccacac cacttgacc ctgctgaggc tttctcatcc caactatctg taggatctga gatctttggt 4140 ctagttgctg tgttgtaag ttccccatat ataccctga agcctggggc ctttcagacc 4200 tcatgatctt ggccctcagc ttctcaaggt cagccgcaag agacatcagt tcttctgcac 4260 tgagcctccc cactttcaaa acattcttct ttgatgttga ctttaaatec acaagagaat 4320 gtacagtctg gttgagactt ctgagtctct gtaggtcttt gtcactctct ttttctctcc 4380 tcatgatcct ctgaacattg ctgacctcag agaagtccaa cccattcaga aggttggttg 4440 catccttaat gacagcagcc ttcacatctg atgtgaagct ctgcaattct cttctcaatg 4500 cttgcgcca ttggaagctc ttaacttctc tagacaagga catcttggtg ctcaatggtt 4560 tctcaagaca aatgcgcaat caaatgccta gqatccactg tgcg 4604 </pre>
11	Cebador específico de WE	5'AATCGTCTCTAAGGATGGGTCAGATTGTGACAATG-3'
12	Cebador de fusión específico de WE que porta un saliente complementario al cebador específico de WET	5'AATCGTCTCTAAGGATGGGTCAGATTGTGACAATG-3'
13	Cebador específico de WET	5'CTCGGTGATCATGTTATCTGCTTCTTGTTGATTGA-3'
14	Cebador de fusión específico de WET complementario a la secuencia de WE	5'AATCGTCTCTTTCTTTATCTCCTCTTCCAGATGG-3'
15	Cebador específico de NP de LCMV	5'-GGCTCCCAGATCTGAAAAGTGT-3'
16	Cebadores específicos de NP y GP; específico de NP: igual que en la reacción de RT, específico de GP: 5'	5'-GCTGGCTTGTCACTAATGGCTC-3'
17	Secuencia representativa de ADNc obtenida del animal no. 3 (r3LCMV-GFPnat no. 3) que revela un segmento S recombinado que combina secuencias de NP y GP	<pre> aagaagcaga taacatgatc accgagatgc 60 tgaggaagga ctacatcaag agacagggca gcacccccct ggccctcatg gatctgctca 120 tgttcagcac cagcgctac ctcatcagca tcttctgca cctgggtaag atccccacc acagacacat caagggcggc agctgcccc 180 agccccacag actcaccac aagggcatct gcagctgctg cgcttcaag gtgcccggcg 240 taaaaacat ctggaagagg agataaagaa caacacctcc ctaactctcc acctcaaaa 300 </pre>

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia	
		aggtggagag t cagggaggc ccagagggtc ttacttgtac agctcgtcca tgccgagagt gatccccggcg gcggtcacga actccagcag gaagaacagc gcctccctga ctctccacct cgaaagaggt ggagagtcag ggaggcccag aggtcttaga gtgtcacaaac atttgggcct ctaaaaatta ggtcatgtgg cagaatgttg tgaacagttt tcaqatctqq qaqcc	360 420 480 535
18	Segmento S 1 de r3LCMV-P1A (que contiene NP)	gcgcacgagg gatöctaggö tttttggatt gcgctttcct ctagatcaac tgggtgtcag gccctatcct acagaaggat gagcgacaac agaagcccg acaaggccca ctctggcagc ggcggagatg gcgacggcaa cagatgtaac ctgctgcaca gatacagcct ggaagagatc ctgccctacc tgggctggct ggtgttcgcc gtcgtgacaa caagcttcct ggccctgcag atgttcatcg acgcccgtga cgaggaacag tacgagaggg acgtggcctg gatcgccaga cagagcaaga gaatgagcag cgtggacgag gacgaggatg atgaggacga cgaagatgac tactacgacg atgaggatga cgacgacgac gccttctacg atgacgagga cgatgaagag gaagaactgg aaaacctgat ggacgacgag tccgaggatg aggccgagga agagatgagc gtggaaatgg gcgctggcgc cgaagagatg ggagccggcg ctaactgtgc ttgctgcca ggacaccacc tgagaaagaa cgaagtgaag tgccggatga tctacttctt ccacgacccc aactttctgg tgtccatccc cgtgaacccc aaagaacaga tggaatgcag atgcgagaac gccgacgaag aggtggccat ggaagaagaa gaggaagagg aagaagaaga agaagaggaa gaaatgggca accccgacgg cttcagcccc tgaagaacag gcctccctg actctccacc tcgaaagagg tggagagtca gggaggccca gagggtctta gagtgtcaca acatttgggc ctctaaaaat taggtcatgt ggcagaatgt tgtgaacagt tttcagatct gggagccttg ctttggaggc gctttcaaaa atgatgcagt ccatgagtgc acagtgcggg gtgatctctt tcttcttttt gtcccttact attccagat gcatcttaca caaccagcca tatttgtccc acactttatc ttcatactcc ctgaaagctt ccctggtcat ttcaacatcg ataagcttaa tgtccttctt attttgtgag tccagaagct ttctgatgtc atcggagcct tgacagctta gaacctccc ctgcggaaga gcacctataa ctgacgaggt caaccgggt tgcgcattga agaggtcggc aagatccatg ccgtgtgagt acttggaaac ttgcttgaat tgtttttgat caacgggttc cctgtaaaag tgtatgaact gccggttctg tggttggaaa attgctattt ccactggatc attaaatcta ccctcaatgt caatccatgt aggagcgttg gggccaattc ctcccatgag gtcttttaaa agcattgtct ggctgtagct taagcccacc tgaggtggac ctgctgctcc aggcgctggc ctgggtgagt tgactgcagg tttctcgctt gtgagatcaa ttgttgtgtt ttcccatgct ctccccacaa tcgatgttct acaagctatg tatggccatc cttcacctga aaqgcaaacct ttatagagga	60 120 180 240 300 360 420 480 540 600 660 720 780 840 900 960 1020 1080 1140 1200 1260 1320 1380 1440 1500 1560

ES 2 811 093 T3

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia	
		tgttttcata agggttcctg tccccaaactt 1620 ggtctgaaac aaacatgttg agttttctct tggccccgag aactgccttc aagagatcct 1680 cgctgttgct tggcttgatc aaaattgact ctaacatgtt acccccatcc aacagggctg 1740 ccctgcctt cacggcagca ccaagactaa agttatagcc agaaatgttg atgctggact 1800 gctgttcagt gatgaccccc agaactgggt gcttgtcttt cagcctttca agatcattaa 1860 gatttgata cttgactgtg taaagcaagc caaggtctgt gagcgcttgt acaacgtcat 1920 tgagcggagt ctgtgactgt ttggccatac aagccatagt tagacttggc atttgcctaa 1980 attgattggt caaaagtgat gagtctttca catcccaaac tcttaccaca ccacttgcac 2040 cctgctgagg ctttctcatc ccaactatct gtaggatctg agatctttgg tctagttgct 2100 gtgttgtaa gttccccata tatacccctg aagcctgggg cctttcagac ctcatgatct 2160 tggccttcag cttctcaagg tcagccgcaa gagacatcag ttcttctgca ctgagcctcc 2220 ccactttcaa aacattcttc tttgatgttg actttaaatc cacaagagaa tgtacagtct 2280 ggttgagact tctgagtctc tgtaggtctt tgtcatctct cttttccttc ctcatgatcc 2340 tctgaacatt gctgacctca gagaagtcca acccatcag aagggttggt gcacccctaa 2400 tgacagcagc cttcacatct gatgtgaagc tctgcaattc tcttctcaat gcttgcgtcc 2460 attggaagct cttaacttcc ttagacaagg acatcttgtt gctcaatggt ttctcaagac 2520 aaatgcgcaa tcaaatgcct aggatccact gtgcg 2555	
19	Segmento S 2 de r3LCMV-P1A (que contiene GP)	gcgcaccggg gatcctagggc tttttggatt gcgctttcct ctagatcaac tgggtgtcag 60 gccctatcct acagaaggat gagcgacaac aagaagcccg acaaggccca ctctggcagc 120 ggcggagatg gcgacggcaa cagatgtaac ctgctgcaca gatacagcct ggaagagatc 180 ctgccctacc tgggctggct ggtgttcgcc gtctgacaaa caagcttcct ggccctgcag 240 atgttcatcg acgcccgtga cgaggaacag tacgagaggg acgtggcctg gatcgccaga 300 cagagcaaga gaatgagcag cgtggacgag gacgaggatg atgaggacga cgaagatgac 360 tactacgacg atgaggatga cgacgacgac gccttctacg atgacgagga cgatgaagag 420 gaagaactgg aaaacctgat ggacgacgag tccgaggatg aggccgagga agagatgagc 480 gtggaatgg gcgctggcgc cgaagagatg ggagccggcg ctaactgtgc ttgctgcca 540 ggacaccacc tgagaaagaa cgaagtgaag tgccggatga tctacttctt ccacgacccc 600 aactttctgg tgtccatccc cgtgaacccc aaagaacaga tggaaatgcag atgcgagaac 660 gccgacgaag aggtggccat ggaagaagaa gaggaagagg aagaagaaga agaagaggaa 720 gaaatgggca accccgacgg cttcagcccc 780 tgaagaacag cgcctccctg actctccacc tcaaaaaaaa tcaaaatca qqqaaqccca	

ES 2 811 093 T3

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia	
		gagggctca gcgtcttttc cagacggttt 840 ttacaccagg caccttaaat gcaccacaac tacaaattcc tttgttggtt aatcgggtgtg 900 gctttggaca tgagccacct tttatgtgcc tgtgtgttg tattttgaca aggtgcagga 960 agatgctgac tagatatgca gatgtggaaa acatcagaag gtccatcaat gctagggggg 1020 tactcccctg cctctttatg taatccttcc tcaacatctc tgtaatcatg ttatcggcct 1080 cctgttcgat ttggtcactg aagtgggtct catttaagta agaaccattg gtgacaagcc 1140 agcacttggg gacactagtt tcgccggctct ttgcatgttc taggtacca aactttgagt 1200 aattgcaata tggcaccctc atcagatctc tcaagtgggt cctcatcagt agttgatctg 1260 aaatcaaaga attcactggt gttttgaata agtgcaaggc agattctacg tcctctttga 1320 acttactcaa agcagccttg ttgtagtcaa ttagtgcag catgtcacag aattcttcat 1380 catgatttac attgcatttc gcaactgctg tgttcccga acaacttaagc tctgcagcaa 1440 gaatcatcca tttggtcagg caataaccac ctggattctc caccctgaa gagtctgaca 1500 aagtccagg gtatgtgccc gctagtctcc tagtggagaa cttagttttc tcttgggaaa 1560 ggagaatcct ggacatcca aaaggacctg catatgtgca gtggttttcc caggttctat 1620 ttgtataat caggatttgg taactcgtct ggctacacca ggtggctctg ccatctgagc 1680 ctgtccagcc ccagccactc ctcatgtatt tcccccgaa ggcagttcta aacatatcta 1740 ggactctacc tctgaaggtt ctacactggc tctgagcact ttgtgcatct gagaatgtca 1800 agttgtattg gatggttatg ccattggtga agtcgcagga tactgcctta tagttggagt 1860 tcctctgat actgaggtgt aggctcgaaa ctatactcat gagggtgtgg tcaaaggctc 1920 tttgttgaa ggcagaggtc agattgcaa agttgtgact gatgatggaa tcattggtga 1980 aggtcaattc tagtccagaa gtcccatac tgatgtaatg gtgggagttg ttggctgaac 2040 atgcttggg catggtcagg ttcagatgtg acatatcaaa ctccactgac ttaaattggt aaactcctt gtaaatgtcg ggtcccttaa 2100 gaccgtacat gccacaggac ctgccagcca 2160 gaagtaggaa actgatcaat gcgaatatcc cacaggtggc aaaattgtag acagccttga 2220 taccgtgat cacgataagc acaataatga caatgtgat cacctcatcg atgatgtgag 2280 gcagagctc aaacattgtc acaatctgac ccatctgtt gctcaatggt ttctcaagac 2340 aaatgcgcaa tcaaatgcct aggatccact gtgcg 2375	
20	Segmento L de r3LCMV-P1A	gcgaccggg gatcctaggc gtttagttgc gctgtttggt tgcacaactt tcttcgtgag 60 gctgtcagaa gtggacctgg ctgatagcga tgggtcaagg caagtccaga gaggagaaag 120 gcaccaatag tacaacacagg gccgaaatcc taccagatac cacctatctt ggccctttaa 180 qctqcaaatc ttactqqcaq aaatttqaca	

ES 2 811 093 T3

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia	
		gcttggaag atgccaatgac cactaccttt 240	
		gcaggcactg tttaaacctt ctgctgtcag 300	
		tatccgacag gtgtcctctt tgtaaatatc 360	
		cattaccaac cagattgaag atatcaacag 420	
		cccaagctc tccacctccc tacgaagagt 480	
		aacaccgtcc ggccccggcc ccgacaaaca 540	
		gcccagcaca agggaaccgc acgtcaccca 600	
		acgcacacag acacagcacc caacacagaa 660	
		cacgcacaca cacacacaca cacaccaca 720	
		cgcaacgcgc cccaccaccg gggggcgccc 780	
		cccccgggg ggccggcccc cgggagcccg 840	
		ggcgagccc cacggagatg cccatcagtc 900	
		gatgtcctcg gccaccgacc cgcccagcca 960	
		atcgtcgcag gacctcccct tgagtctaaa 1020	
		cctgcccccc actgtttcat acatcaaagt 1080	
		gctcctagat ttgctaaaaac aaagtctgca 1140	
		atccttaaag gcgaaccagt ctggcaaaaag 1200	
		cgacagtgga atcagcagaa tagatctgtc 1260	
		tatacatagt tcttgaggga ttacacttat 1320	
		ctctgaacct aacaaatggt caccagttct 1380	
		gaatcgatgc aggaagaggt tcccaggac 1440	
		atcactaatc ttttcatagc cctcaagtc 1500	
		tgctagaaag actttcatgt ccttggctc 1560	
		cagcttcaca atgatatttt ggacaagggt 1620	
		tcttccttca aaaagggcac ccatctttac 1680	
		agtcagtggc acaggctccc actcaggctc 1740	
		aaactctctc aagtcaatag atctaattcc 1800	
		atccagtatt ctttgggagc ccaacaactc 1860	
		aagctcaaga gaatcaccaa gtatcaaggg 1920	
		atcttccatg taatcctcaa actcttcaga 1980	
		tctgatatca aagacacccat cgttcacctt 2040	
		gaagacagag tctgtcctca gtaagtggag	
		gcattcatcc aacattcttc tatctatctc	
		acccttaaag aggtgagagc atgataaaaag	
		ttcagccaca cctggattct gtaattggca	
		cctaaccaag aatatcaatg aaaatttcct	
		taaacagtca gtattattct gattgtgcgt	
		aaagtccact gaaattgaaa actccaatac	
		cccttttggt tagttgagca tgtagtcca	
		cagatccctt aaggatttaa atgcctttgg	
		gtttgtcagg cctgcctaa tcaacatggc	
		agcattacac acaacatctc ccattcggta	
		agagaaccac ccaaaaccaa actgcaaatc	
		attcctaaac ataggcctct ccacattttt	
		gttcaccacc ttgagacaa atgattgaaa	
		ggggcccagt gcctcagcac catcttcaga	
		tggcatcatt tctttatgag ggaaccatga	
		aaaattgcct aatgtcctgg ttgttgcaac	
		aaattctcga acaaatgatt caaaatacac	
		ctgttttaag aagttcttgc agacatccct	
		cggtctaaca acaaattcat caaccagact	
		ggagtcagat cgctgatgag aattggcaag	
		gtcagaaaac agaacagtgt aatgttcatc	
		cctttccac ttaacaacat gagaaatgag	
		tgacaaggat tctgagttaa tatcaattaa	
		aacacagagg tcaaggaatt taattctggg	
		actccacctc atgttttttg agctcatgtc	
		agacataaat ggaagaagct gatcctcaa	
		gatcttggga tatagccgcc tcacagattg	
		aatcaacttg ttcaaattca ctttgcctc	
		caqtagcctt gagctctcag gctttcttgc	

ES 2 811 093 T3

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
		tacataatca catggggttta agtgcttaag agttagggttc tcaactggttat tcttcccttt 2100 ggtcgggttct gctaggaccc aaacacccaa ctcaaaagag ttgctcaatg aaatacaaat 2160 gtagtcccaa agaagaggcc ttaaaaggca tatatgatca cgggtgggctt ctggatgaga 2220 ctgtttggtca caaatgtaca gcgttatacc atcccgattg caaactcttg tcacatgatc 2280 atctgtgggt agatcctcaa gcagcttttt gatatacaga ttttccctat tttgtttct 2340 cacacacctg cttcctagag ttttgcaaag gcctataaag ccagatgaga tacaactctg 2400 gaaagctgac ttgttgattg cttctgacag cagcttctgt gcaccccttg tgaatttact 2460 acaaagtttg ttctggagtg tcttgatcaa tgatgggatt ctttctctct ggaaagtcac 2520 cactgatgga taaaccacct ttgtcttaa aacctcctt aatgggaaca tttcattcaa 2580 attcaaccag ttaacatctg ctaactgatt cagatcttct tcaagaccga ggaggtctcc 2640 caattgaaga atggcctcct ttttatctct gttaaatagg tctaagaaaa attcttcatt 2700 aaattcacca tttttgagct tatgatgcag tttccttaca agctttctta caaccttctg 2760 tcattagga cacagttcct caatgagctc ttgtattctg taacctctag aacctccag 2820 ccaatcttcc acatcagtg tggattcag tagaaatgga tccaaagggg aattggcata 2880 ctttagggagg tccagtggtc tctttggat actattaact agggagactg ggacgccatt 2940 tgcgatggct tgatctgcaa ttgtatctat tgtttcacia agttgatgtg gctctttaca 3000 cttgacattg tgtagcgctg cagatacaaa ctttgtgaga agagggactt cctccccca 3060 tacatagaat ctagatttaa attctgcagc gaacctccca gccacacttt ttgggctgat 3120 aaatttgttt aacaagccgc tcagatgaga ttggaattcc aacaggacaa ggacttcctc 3180 cggatcactt acaaccaggt cactcagcct cctatcaaat aaagtgatct gatcatcact 3240 tgatgtgtaa gcctctggtc tttcgccaaa gataaacacca atgcagtagt tgatgaacct 3300 ctcgctaagc aaacctataga agtcagaagc attatgcaag attccctgcc ccatatcaat 3360 aaggctggat atatgggatg gcaactatccc catttcaaaa tattgtctga aaattctctc 3420 agtaacagtt gtttctgaac cctgagaag ttttagcttc gacttgacat atgatttcat 3480 cattgcattc acaacaggaa aggggacctc gacaagctta tgcatgtgcc aagttaacaa 3540 agtgctaaca tgatctttcc cggaacgcac atactggtca tcacctagt ttgagattttg 3600 tagaaacatt aagaacaaaa atgggcacat cattggtccc catttgctgt gatccatact 3660 atagtttaag aacccttccc gcacattgat agtcattgac aagattgcat tttcaaattc 3720 cttatcattg tttaaacagg agcctgaaaa 3780 gaaactgaa aaagactcaa aataatcttc tattaacctt gtgaacattt ttgtcctcaa 3840 atctccaata tagagttctc tatttcccc aacctgctct ttataagata gtgcaaat

ES 2 811 093 T3

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia	
		cagccttcca gagtcaggac ctactgaggt	3900
		gtatgatggt ggtgattcct ctgagtagaa	
		gcacagatth ttcaaagcag cactcataca	3960
		ttgtgtcaac gacagagcct tactaagggga	
		ctcagaatta ctttocctct cactgattct	4020
		cacgtcttct tccagtttgt cccagtcaaa	
		tttgaaatcc aagccttgcc tttgcatatg	4080
		cctgtatttc cctgagtacg catttgcatc	
		catttgcaac agaatcatct tcatgcaaga	4140
		aaaccaatca ttctcagaaa agaactttct	
		acaaagggtt tttgccatct catcgaggcc	4200
		acactgatct ttaatgactg aggtgaaata	
		caaagggtgac agctctgtgg aaccctcaac	4260
		agcctcacag ataaatttca tgcacatcatt	
		ggttagacat gatgggtcaa agtcttctac	4320
		taaatggaaa gatatttctg acaagataac	
		ttttcttaag tgagccatct tccctgttag	4380
		aaataagctgt aaatgatgta gtccttttgt	
		atttgaagt tttctccat ctctttgtc	4440
		attggccctc ctacctcttc tgtaccgtgc	
		tattgtggtg ttgacctttt ctctcgagact	4500
		tttgaagaag cttgtctctt cttctccatc	
		aaaacatatt tctgccaggt tgtcttccga	4560
		tctccctgtc tcttctccct tggaaaccgat	
		gaccaatcta gagactaact tggaaacttt	4620
		atattcatag tctgagtggc tcaacttata	
		cttttgtttt cttacgaaac tctcogtaat	4680
		ttgactcaca gcactaacia gcaatttggt	
		aaagtcatat tccagaagtc gttctccatt	4740
		tagatgctta ttaaccacca cacttttggt	
		actagcaaga tctaagtctg tgcacatcc	4800
		agagttagtc atgggatcta ggctgttag	
		cttcttctct cctttgaaaa ttaaagtgcc	4860
		gttgttaaat gaagacacca ttaggctaaa	
		ggcttcaga ttaaaccttg gagttgtatg	4920
		ctgacagtca atttctttac tagtgaatct	
		cttcatttgc tcatagaaca cacattcttc	4980
		ctcaggagtg attgcttctc tggggttgac	
		aaaaaaacca aattgacttt tgggctcaaa	5040
		gaacttttca aaacatttta tctgatctgt	
		tagcctgtca ggggtctctc ttgtgatcaa	5100
		atgacacagg tatgacacat tcaacataaa	
		tttaaatttt gcaactcaaca acaccttctc	5160
		accagtacca aaaatagttt ttattaggaa	
		tctaagcagc ttatacacca ccttctcagc	5220
		aggtgtgatc agatcctccc tcaacttatc	
		cattaatgat gtagatgaaa aatctgacac	5280
		tattgccatc accaaatata tgacactctg	
		tacctgcttt tgatttctct ttgttgggtt	5340
		ggtgagcatt agcaacaata gggctctcag	
		tgaacctca atgtcgggtga gacagctctt	5400
		caaatcagga catgatctaa tccatgaaat	
		catgatgtct atcatattgt ataagacctc	5460
		atctgaaaaa attggtaaaa agaactttt	
		aggatctgca tagaaggaaa ttaaagtacc	5520
		atcgggacct tgtatggagt agcaccttga	
		agattctcca gtcttctggg ataataagggtg	5580
		gtattcttca gagtccagtt ttattacttg	
		gcaaaacact tctttgcatt ctaccacttg	5640
		atatctcaca gacctatth gattttgcct	
		taqtctagca actgagctag ttttctact	5700

ES 2 811 093 T3

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia	
		gtttgttaag gccagacaaa cagatgataa tcttctcagg ctctgtatgt tcttcagctg ctctgtgctg ggttggaat tgtaatcttc aaacttcgta taatacatta tcgggtgagc tccaattttc ataaagttct caaattcagt gaatggtatg tggcattctt gctcaagggtg ttcagacagt ccgtaatgct cgaaactcag tcccaccact aacaggcatt tttgaatttt tgcaatgaac tcaactaatag atgcccataa caattcctca aaagacacct ttctaaacac ctttgacttt tttctattcc tcaaaagtct aatgaactcc tctttagtgc tgtgaaagct taccagccta tcattcacac tactatagca acaaccacc cagtgtttat ctttttttaa ccctttgaat ttcgactggt ttatcaatga ggaaagacac aaaacatcca gatttaacaa ctgtctcctt ctagtattca acagtttcaa actcttgact ttgtttaaca tagagaggag cctctcatat tcagtgctag tctcacttcc ccttcgtgc ccatgggtct ctgcagttat gaatctcatc aaaggacagg attcgactgc ctccctgctt aatgtaaga tatcatcact atcagcaagg ttttcataga gctcagagaa ttccttgatc aagccttcag ggtttacttt ctgaaagtth ctctttaatt tcccactttc taaatctctt ctaaacctgc tgaagagaga gtttattcca aaaaccacat catcacagct catgttgggg ttgatgcctt cgtggcacat cctcataatt tcatcattgt gagttgacct cgcatctttc agaattttca tagagtccat accggagcgc ttgtcgatag tagtcttcag ggactcacag agtctaaaaat attcagactc ttcaagact ttctcatttt ggttagaata ctccaaaagt ttgaataaaa ggtctctaaa tttgaagtth gccactctg gcataaaaact attatcataa tcacaacgac catctactat tggaactaat gtgacaccgc caacagcaag gtcttcctg atgcatgcca atttgttagt gtcctctata aatttcttct caaaactggc tggagtgtc ctaacaaaac actcaagaag aatgagagaa ttgtctatca gcttgaacc atcaggaatg ataagtggta gtccctgggca tacaattcca gactccacca aaattgtttc cacagactta tcgtcgtggt tgtgtgtgca gccactctg tctgactgt ctatttcaat gcagcgtgac agcaacttga gtccctcaat cagaaccatt ctgggttccc tttgtcccag aaagttagt ttctgccttg acaacctctc atcctgttct atatagttta aacataactc tctcaattct gagatgattt catccattgc gcatcaaaaa gcctaggatc ctcgggtgcg 7229	5760 5820 5880 5940 6000 6060 6120 6180 6240 6300 6360 6420 6480 6540 6600 6660 6720 6780 6840 6900 6960 7020 7080 7140 7200
21	Segmento S 1 de r3JUNV-P1A (que contiene NP)	gcgcaccggg gatcctaggc gattttgggt acgctataat tgtaactggt ttctgtttg acaacatcaa aaacatccat tgcacaatga gcgacaacaa gaagcccgc aaggccact ctggcagcgg cgggatggc gacggcaaca gatgtaacct gctgcacaga tacagcctgg aagagatcct gccctacctg ggctggctgg tqttaqcqat cqtqacaaca aqcttctq	60 120 180 240

ES 2 811 093 T3

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
		cctgcagat gttcatcgac gcctgtacg aggaacagta cgagagggac gtggcctgga 300 tcgccagaca gagcaagaga atgagcagcg tggacgagga cgaggatgat gaggacgacg 360 aagatgacta ctacgacgat gaggatgacg acgacgacgc cttctacgat gacgaggacg 420 atgaagagga agaactggaa aacctgatgg acgacgagtc cgaggatgag gccgaggaag 480 agatgagcgt ggaaatgggc gctggcgccg aagagatggg agccggcgct aactgtgctt 540 gcgtgccagg acaccacctg agaaagaacg aagtgaagtg ccggatgatc tacttcttcc 600 acgaccccaa ctttctggtg tccatccccg tgaaccccaa agaacagatg gaatgcagat 660 gcgagaacgc cgacgaagag gtggccatgg aagaagaaga ggaagaggaa gaagaagaag 720 aagaggaaga aatgggcaac ccgacggct tcagcccctg agacctcctg agggctccca 780 ccagcccggg cactgcccgg gctggtgtgg ccccccagtc cgcggcctgg ccgcgactg 840 gggaggcact gcttacagtg cataggctgc cttcgggagg aacagcaagc tcggtggtaa 900 tagagggtga ggttctctct catagagctt cccatctagc actgactgaa acattatgca 960 gtctagcaga gcacagtgtg gttcactgga ggccaacttg aagggagtat ctttttccct 1020 ctttttctta ttgacaacca ctccattgtg atatttgcac aagtgacctt atttctccca 1080 gacctgttga tcaaactgcc tggcttgttc agatgtgagc ttaacatcaa ccagtttaag 1140 atctcttctt ccatggaggt caaacaactt cctgatgtca tcggatcctt gagtagtcac 1200 aaccatgtct ggaggcagca agccgatcac 1260 gtaactaaga actcctggca ttgcatcttc tatgtccttc attaagatgc cgtgagagtg tctgctacca tttttaaacc ctttctcatc 1320 atgtggtttt ctgaagcagt gaatgtactg cttacctgca ggttgggaata atgccatctc 1380 aacaggggtca gtggctggtc cttcaatgtc gagccaaagg gtgttgggtg ggtcgagttt 1440 cccactgcc tctctgatga cagcttcttg tatctctgtc aagttagcca atctcaaatt ctgaccggtt ttttccggct gtctaggacc 1500 agcaactggg ttccttgtca gatcaatact 1560 tgtgttgtcc catgacctgc ctgtgatttg tgatctagaa ccaatataag gccaacatc 1620 gccagaaaga caaagtttgt acaaaagggt ttcataagga tttctattgc ctggtttctc 1680 atcaataaac atgccttctc ttcgtttaac ctgaatgggt gattttatga gggaagagaa 1740 gttttctggg gtgactctga ttgtttccaa catgtttcca ccatcaagaa tagatgctcc 1800 agcctttact gcagctgaaa gactgaagtt gtaaccagaa atattgatgg agctttcatc 1860 tttagtcaca atctgaaggc agtcatgttc ctgagtcagt ctgtcaaggc cacttaagtt 1920 tggatacttc acagtgtata gaagcccaag tgaggttaaa gcttgatga cactgttcat 1980 tgtctcacct ccttgaacag tcatgcatgc aattgtcaat gcaggaacag agccaaactg 2040 attgtttaac tttgaagggt ctttaacatc

ES 2 811 093 T3

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia	
		ccatatcctc accacacccat ttccccagt 2100 cccttgctgt tgaaatocca gtgttctcaa tatctctgat cttttagcaa gttgtgactg 2160 ggacaagtta cccatgtaaa ccccctgaga gectgtctct gctcttctta tcttgttttt 2220 taatttctca aggtcagacg ccaactccat cagttcatcc ctccccagat ctcccacett 2280 gaaaactgtg tttcgttgaa cactcctcat ggacatgagt ctgtcaacct ctttattcag 2340 gtccctcaac ttggtgagat cttcttcccc cttttagtc tttctgagtg cccgctgcac 2400 ctgtgccact tggttgaagt cgatgctgtc agcaatagc ttggcgctct tcaaacatc 2460 tgacttgaca gtctgagtgga attggctcaa acctctcctt aaggactgag tccatctaaa 2520 gcttgaacc tccttggagt gtgcatgccc agaagtctg gtgattttga tctagaatag 2580 agttgctcag tgaaagtgtt agacactatg ctaggatcc actgtgcg 2628	
22	Segmento S 2 de r3JUNV-P1A (que contiene GP)	gcgaccggg gatcctaggc gattttgggtt 60 acgctataat tgtaactggt ttctgtttg acaacatcaa aaacatccat tgcacaatga gcgacaacaa gaagcccagc aaggccact 120 ctggcagcgg cggagatggc gacggcaaca gatgtaacct gctgcacaga tacagcctgg 180 aagagatcct gccctacctg ggctggctgg tgttcgccgt cgtgacaaca agcttctctg 240 ccctgcagat gttcatcgac gccctgtacg aggaacagta cgagagggac gtggcctgga 300 tcgccagaca gagcaagaga atgagcagcg tggacgagga cgaggatgat gaggacgacg 360 aagatgacta ctacgacgat gaggatgacg acgacgacgc cttctacgat gacgaggacg 420 atgaagagga agaactggaa aacctgatgg acgacgagtc cgaggatgag gccgaggaag 480 agatgagcgt ggaaatgggc gctggcgccg aagagatggg agccggcgct aactgtgctt 540 gctgcccagg acaccacctg agaaagaacg aagtgaagtg ccggatgatc tacttcttcc 600 acgaccccaa cttctgggtg tccatccccg tgaaccccaa agaacagatg gaatgcagat 660 gcgagaacgc cgacgaagag gtggccatgg aagaagaaga ggaagaggaa gaagaagaag 720 aagaggaaga aatgggcaac cccgacggct tcagcccctg agacctcctg agggccccca 780 ccagcccggg cactgcccgg gctgggtgtgg 840 ccccccagtc cgcggcctgg ccgcgactg gggaggcact gcatggggca gttcattagc ttcatgcaag aaataccaac ctttttgcag 900 gaggctctga acattgctct tgttgcagtc agtctcattg ccatcattaa gggatagtg 960 aacttgataa aaagtggttt attccaattc tttgtattcc tagcgttgc aggaagatcc 1020 tgcacagaag aagctttcaa aatcgactg cacactgagt tccagactgt gtccttctca 1080 atgggtgggtc tcttttccaa caatccacat gacctacctt tggtgtgtac cttaacaag 1140 agccatctt acattaaggg gggcaatgct tcatttcaga tcagctttga tgatattgca 1200 qtattqtac cacactatqa tqtataata	

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia	
		caacatccag cagatatgag ctggtgttcc 1260	
		aaaagtgatg atcaaatttg gttgtctcag 1320	
		tggttcatga atgctgtggg acatgattgg 1380	
		catctagacc caccatttct gtgtaggaac 1440	
		cgtgcaaaga cagaaggctt catctttcaa 1500	
		gtcaacacct ccaagactgg tgtcaatgga 1560	
		aattatgcta agaagttaa gactggcatg 1620	
		catcatttat atagagaata tcctgaccct 1680	
		tgcttgaatg gcaaacctgtg cttaatgaag 1740	
		gcacaaccta ccagttggcc tctccaatgt 1800	
		ccactcgacc acgttaacac attacacttc 1860	
		cttacaagag gtaaaaacat tcaacttcca 1920	
		aggaggtcct tgaaagcatt cttctcctgg 1980	
		tctttgacag actcatccgg caaggatacc 2040	
		cctggaggct attgtctaga agagtggatg 2100	
		ctcgtagcag ccaaaatgaa gtgttttggc 2160	
		aatactgctg tagcaaatg caatttgaat 2220	
		catgactctg aattctgtga catgttgagg 2280	
		ctctttgatt acaacaaaaa tgctatcaaa 2340	
		accctaaatg atgaaactaa gaaacaagta 2391	
		aatctgatgg ggcagacaat caatgccttg 1860	
		atatctgaca atttattgat gaaaaacaaa 1920	
		attagggaac tgatgagtgt cccttactgc 1980	
		aattacacaa aattttggta tgtcaaccac 2040	
		acactttcag gacaacactc attaccaagg 2100	
		tgctggtaa taaaaaacia cagctatttg 2160	
		aacatctctg acttccgtaa tgactggata 2220	
		ttagaaagtg acttcttaat ttctgaaatg 2280	
		ctaagcaaaag agtattcgga caggcagggt 2340	
		aaaactcctt tgactttagt tgacatctgt 2391	
		atltggagca cagtattctt cacagcgtca 2160	
		ctcttccttc acttgggtggg tataccctcc 2220	
		cacagacaca tcaggggcca agcatgcctc 2280	
		ttgccacaca ggttgaacag cttgggtggt 2340	
		tgacatctgt cagctatttg 2160	
		caatctaaag 2280	
		aggcactaa 2340	
		g 2391	
23	Segmento L de r3JUNV-P1A	gcgcaccggg gatcctaggg gtaacttcat 60	
		cattaaaatc tcagattctg ctctgagtgt 120	
		gacttactgc gaagagggcag acaaatgggc 180	
		aactgcaacg gggcatccaa gtctaaccag 240	
		ccagactcct caagagccac acagccagcc 300	
		gcagaattta ggagggtagc tcacagcagt 360	
		ctatatggta gatataactg taagtgtctg 420	
		tggtttgctg ataccaatth gataacctgt 480	
		aatgatcaact acctttgtht aagggtccat 540	
		cagggatgt taaggaattc agatctctgc 600	
		aatatctgct ggaagccctt gccaccacaa 360	
		atcacagtac cgggtggagcc aacagcacca 420	
		ccaccatagg cagactgcac agggtcagac 480	
		ccgaccccc gggggggccc catggggacc 540	
		ccccgtggg gaaccccggg ggtgatgccc 600	
		cattagtcaa tgtctttgat ctcgactttg 600	
		tgcttcagtg gcctgcatgt caccctttc 600	
		aatctgaact gccctgggg atctgatctc 600	
		agcaggtcat ttaaagatct gctgaatgcc 600	
		accttgaat ttgagaattc caaccagtca 600	
		ccaaattht caaqtqaacq qatcaactac	

ES 2 811 093 T3

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia	
		tctttgtgta gatcataaac gaggacaaaag 660	
		tcctcttgct gaaataatat tgtttggat 720	
		gttggtttta gataaggcca tagttggctt 780	
		aataagggtt ccacactatc aatgtcctct	
		agtgctccaa ttgccttgac tatgacatcc 840	
		ccagacaact caactctata tggtagacaac	
		ctttcattac ctctgtaaaa gataccctct 900	
		ttcaagacaa gaggttctcc tgggttatct	
		ggcccaatga ggcatatgc atacttgta	
		cttagttcag aataaaagtc accaaagttg 960	
		aacttaacat ggctcagaat attgtcatca	
		ttgtctgcag cgtagcctgc atcaataaac	
		aagccagcta ggtcaaagct ctcatggcct 1020	
		gtgaacaatg gtaggctagc gataaccagt	
		gcaccatcca acaatgagtg gcttccctca 1080	
		gaccagaaa cacattgact cattgcatcc	
		acattcagct ctaattcagg ggtaccgaca 1140	
		tcatccactc ctagtgaact gacaatggtg	
		taactgtaca ccactttct tctaagttta 1200	
		aattttgcg aaactcgtgt gtgttctact	
		tgaatgatca attttagttt cacagcttct 1260	
		tggcaagcaa cattgcgcaa cacagtggtc	
		aggtccatca tgtcttcctg aggcaacaag 1320	
		gagatgttgt caacagagac accctcaagg	
		aaaaccttga tattatcaaa gctagaaact 1380	
		acataaccca ttgcaatgtc ttcaacaaac	
		attgctcctg atactttatt attcctaact 1440	
		gacaaggtaa aatctgtgag ttcagctaga	
		tctacttgac tgtcatcttc tagatctaga 1500	
		acttcattga accaaaagaa ggatttgaga	
		cacgatgttg acatgactag tgggtttatc 1560	
		atcgaagata agacaacttg caccatgaag	
		ttcctgcaaa cttgctgtgg gctgatgcca 1620	
		acttcccaat ttgtatactc tgactgtcta	
		acatgggctg aagcgcaatc actctgtttc 1680	
		acaatataaa cattattatc tcttactttc	
		aataagtgac ttataatccc taagttttca 1740	
		ttcatcatgt ctagagccac acagacatct	
		agaaacttga gtcttcact atccaaagat 1800	
		ctgttcactt gaagatcatt cataaagggt	
		gccaaatgtt cttcaaatag ttgggggtaa 1860	
		ttctctcgta tagaatgcaa tacatggttc	
		atgcctaatt ggtcttctat ctgtcgtact 1920	
		gctttggggt taacagccca gaagaaattc	
		ttattacata agaccagagg ggctgtgga 1980	
		ctcttaatag cagaaaacac ccaactccct	
		aactcacagg catttgtcag caccaaagag 2040	
		aagtaatccc acaaaattgg tttagaaaa	
		tggttaactt ctttaagtga tttttgacag 2100	
		taaataactt taggctttct ctcaaaatt	
		ccacaaagac atggcattat tcgagtaaat 2160	
		atgtccttta tatacagaaa tccgccttta	
		ccatccctaa cacacttact cccatactc 2220	
		ttacaaaacc caatgaagcc tgaggcaaca	
		gaagactgaa atgcagattt gttgattgac 2280	
		tctgccaaga tcttcttcac gcttttggg	
		aaatttcttg acagcctgga ctgtattgtc 2340	
		cttatcaatg ttggcatctc ttctttctct	
		aacactcttc gacttgtcat gagtttggtc 2400	
		ctcaagacca acctcaagtc cccaaagctc	
		gctaattga cccatctgta gtctagagtt 2460	

ES 2 811 093 T3

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
		tgtctgattt catcttcact acaccggca 2520
		tattgcagga atccggataa agcctcatcc 2580
		cctccccctgc ttatcaagtt gataaggttt
		tcctcaaaga ttttgccctct cttaatgtca 2640
		ttgaacactt tctctgcgca gttccttata
		aacattgtct ccttatcatc agaaaaata 2700
		gcttcaattt tctctgttag acggtagcct
		ctagaccat caaccagtc ttgacatct
		tgttcttcaa tagctccaaa cggagtctct 2760
		ctgtatccag agtatcta attggttg
		actctaattg aaatctttga cactatatga
		gtgctaacc cattagcaat acattgatca 2820
		caaattgtgt ctatggtctc tgacagttgt
		gttggagttt tacacttaac gttgtgtaga 2880
		gcagcagaca caaacttggg gagtaaagga
		gtctcttcac ccatgacaaa aaatcttgac 2940
		ttaaactcag caacaaaagt tctatcaca
		ctctttgggc tgataaactt gtttaattta 3000
		gaagataaga attcatggaa gcacaccatt
		tccagcagtt ctgtcctgtc ttgaaacttt 3060
		tcatcactaa ggcaaggaat tttataagg
		ctaacctggg catcgctgga ggtataagtg 3120
		acaggtatca catcatacaa taagtcaagt
		gcataacaca gaaattgttc agtaattagc 3180
		ccatataaat ctgatgtgtt gtgcaagatt
		ccctggcca tgtccaagac agacattata 3240
		tggctgggga cctggctcct tgactgcaga
		tactggtgaa aaaactcttc accaacta 3300
		gtacagtcac aaccattaa acctaaagat
		ctcttcaatt tccctacaca gtaggcttct 3360
		gcaacattaa ttggaacttc aacgacctta
		tgaagatgcc atttgagaat gttcattact 3420
		ggttcaagat tcacctttgt tctatctctg
		ggattcttca attctaattg gtacaaaaaa 3480
		gaaaggaaaa gtgctgggct catagttggg
		ccccatttgg agtggctcata tgaacaggac 3540
		aagtcaccat tgtaacagc cttttcata
		tcacagattg cacggttcgaa ttccttttct 3600
		gaattcaagc atgtgtattt cattgaacta
		ccacagctt ctgagaagtc tccaactaac 3660
		ctggctatca gcttagtgtt gaggtctccc
		acatacagtt ctctatttga gccaacctgc 3720
		tccttataac ttagtccaaa ttccaagttc
		cctgtatttg agctgatgct tgtgaactct 3780
		gtaggagagt cgtctgaata gaaacataaa
		ttccgtaggg ctgcatttgt aaaataactt 3840
		ttgtctagct taccagcaat ggcttcagaa
		ttgctttccc tggtaactaag ccgaacctca 3900
		tcctttagtc tcagaacttc actggaaaag
		ccaatctag atctacttct atgctcataa 3960
		ctacccaatt tctgatcata atgtccttga
		attaagaat acttgaagca ttcaaagaat 4020
		tcatcttctt ggtaggctat tgttgtcaaa
		ttttttaata acaaacccaa agggcagatg 4080
		tctctgggtg cttcaagaaa ataagtcaat
		ttaaatggag atagataaac agcatcacat 4140
		aactctttat acacatcaga cctgagcaca
		tctggatcaa aatccttcac ctcatgcatt 4200
		gacacctctg ctttaatctc tctcaacact
		ccaaaagggg ccacaatga ctcaagagac 4260
		tctcgtcat caacagatgg attttttgat

ES 2 811 093 T3

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia	
		ttcaacttgg tgatctcaac ttttgtcccc 4320	
		tcactattag ccatcttggc tagtgtcatt 4380	
		tgtacgcat ttctaatacc ctcaaaggcc 4440	
		cttacttgat cctctgttaa actctcatac 4500	
		atcactgata attcttcttg attgggtctg 4560	
		gttcttgaac cgggtgtcac aagaacctgtt 4620	
		agatTTTTTA atattaagta gtccatggaa 4680	
		tcaggatcaa gattatacct gccttttgtt 4740	
		ttaaacctct cagccatagt agaaacgcat 4800	
		gttgaacaa gtttctcctt atcataaaca 4860	
		gaaagaatat ttccaagttc gtcgagcttg 4920	
		gggattacca cacttttatt gcttgacaga 4980	
		tcagagctg tgctagtgat gttaggcctg 5040	
		tagggattgc ttttcagttc acctgtaact 4740	
		ttaagtcttc ctctattgaa gagagaaatg 4800	
		cagaaggaca aaatctcctt acacactcct 4860	
		ggaatttgag tatctgagga agtcttagcc 4920	
		tctttggaaa agaactctgtc caatcctctt 4980	
		atcatgggtg cctcttggtc cagtgttaga 5040	
		ctcccaacta gaggggggtt tacaacaaca 5100	
		caatcaaaact tgactttggg ctcaataaac 5160	
		ttctcaaaac actttatltg atctgtcagg 5220	
		cgatcaggty tctctttggt taccaagtga 5280	
		cacagataac taacatttaa tagatattta 5340	
		aaccttcttg caaagtaaag atctgcatct 5400	
		tccccttcac ccaaaattgt ctggaaaagt 5460	
		tcacagcca tctctgaaat cagcacctct 5520	
		gatccagaca tgcagtcgac ccttaacttt 5580	
		gacatcaaat ccacatgatg gatttgattt 5640	
		gcatatgcca tcagaaata tcttagacct 5700	
		tgtaaaaatg tctggttcct tttggaagg 5760	
		gaacagagta cagctaacac taacaactct 5820	
		aatattggcc ttgtcattgt catgagttcg 5880	
		lygctaaaat ccaaccagct ggtcatttcc 5940	
		tcacacattt caattaacac atcctccgaa 6000	
		aatataggca ggaaaaatct ctttggatca 6060	
		cagtaaaaag agccttggtc ttccaatacc 6120	
		ccattgatgg atagatagat agaatagcac 6180	
		cttgacttct cacctgtttt ttggtaaaac 6240	
		aagagaccaa atgtattctt tgtcagatga 6300	
		aatctttgta cataaacctc tcttagtcta 6360	
		acattoccaa aatatctaga atactctctt 6420	
		tcattgatta acaatcggga ggaaaatgat 6480	
		gtcttcatcg agttgaccaa tgcaagggaa 6540	
		atggaggaca aaatcctaaa taatttcttc 6600	
		tgctcacctt ccactaagct gctgaaatggc 6660	
		tgatgtctac agattttctc aaattccttg 6720	
		ttaatagtat atctcatcac tggctctgtca 6780	
		gaaacaagtg cctgagctaa aatcatcaag 6840	
		ctatccatat caggggtgtt tattagtttt 6900	
		tcagctgtg accagagatc ttgatgagag 6960	
		ttcttcaatg ttctggaaca cgcttgaacc 7020	
		cacttggggc tggatcaata tttcttctt 7080	
		atagtttaa tgcctccag aatatctaga 7140	
		agtctgtcat tgactaacat taacatttgt 7200	
		ccaacaacta ttcccgcat tcttaacctt 7260	
		acaattgcat catcatgcgt tttgaaaaga 7320	
		tcacaaagta aattgagtaa aactaagtcc 7380	
		agaaacagta aagtgttct cctgggtgtg 7440	
		aaaactttta gacctttcac tttggtacac 7500	
		acqgaaagg cttgaagata acacctctct 7560	

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
		acagcatcaa tagatataga attctcatct gactggcttt ccatggtgac ttcattctatt 6180 ggatgcaatg cgatagagta gactacatcc atcaacttgt ttgcacaaaa agggcagctg 6240 ggcacatcac tgtctttgtg gcttcctaata aagatcaagt catttataag cttagacttt 6300 tgtgaaaatt tgaatttccc caactgcttg tcaaaaatct cttctttaa ccaaacctt 6360 aactttatga gttcttctct tatgacagat tctctaattgt ctctctaac cccaacaaag 6420 agggattcat ttaacctctc atcataacc aaagaattct tttcaagca ttcgatgtt 6480 tctaattcca agctctgggt ttttgggtg gacaaactat ggatcaatcg ctggtattct 6540 tgttcttcaa tattaatctc ttgcataaat tttgatctc ttaggatgtc gatcagcaac 6600 caccgaactc tttcaacaac ccaatcagca agaatctat tgctgtagct agatctgcca 6660 tcaaccacag gaaccaacgt aatccctgcc cttagtaggt cggactttag gtttaagagc 6720 ttgacatgt cactcttcca tttctctca aactcatcag gattgacct aacaagggt 6780 tccaatagga tgagtgttt ccctgtgagt ttgaagccat ccggaatgac ttttggagg 6840 gtgggacata gtatgccata gtcagacagg atcacatcaa caaacttctg atctgaattg 6900 atctgacagg cgtgtgctc acaggactca agctctacta aacttgacag aagtttgaac 6960 cctccaaca acagagagct ggggtgatgt tgagataaaa agatgtccct ttggtagct 7020 agctcctgtc tttctggaaa atgctttcta ataaggcttt ttatttcatt tactgattcc 7080 tccatgctca agtgccgctc aggatcctcg gtgcg 7115
24	Secuencia de aminoácidos de un autoantígeno P1A derivado de mastocitoma de ratón P815	Met Ser Asp Asn Lys Lys Pro Asp Lys Ala His Ser Gly Ser Gly Gly Asp Gly Asp Gly Asn Arg Cys Asn Leu Leu His Arg Tyr Ser Leu Glu Glu Ile Leu Pro Tyr Leu Gly Trp Leu Val Phe Ala Val Val Thr Thr Ser Phe Leu Ala Leu Gln Met Phe Ile Asp Ala Leu Tyr Glu Glu Gln Tyr Glu Arg Asp Val Ala Trp Ile Ala Arg Gln Ser Lys Arg Met Ser Ser Val Asp Glu Asp Glu Asp Asp Glu Asp Asp Glu Asp Asp Tyr Tyr Asp Asp Glu Asp Asp Asp Asp Asp Ala Phe Tyr Asp Asp Glu Asp Asp Glu Glu Glu Glu Leu Glu Asn Leu Met Asp Asp Glu Ser Glu Asp Glu Ala Glu Glu Glu Met Ser Val Glu Met Gly Ala Gly Ala Glu Glu Met Gly Ala Gly Ala Asn Cys Ala Cys Val Pro Gly His His Leu Arg Lys Asn Glu Val Lys Cys Arg Met Ile Tyr Phe Phe His Asp Pro Asn Phe Leu Val Ser Ile Pro Val Asn Pro Lys Glu Gln Met Glu Cys Arg Cys Glu Asn Ala Asp Glu Glu Val Ala Met Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Met Gly Asn Pro Asp Gly Phe Ser Pro

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Ginebra

<120> ARENAVIRUS TRISEGMENTADOS COMO VECTORES DE VACUNAS

<130> 103931PC

5 <140> para ser asignado
<141> en la misma fecha que la presente

<150> US 62/079.493

<151> 13-11-2014

<160> 24

10 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 3376

<212> ADN

<213> Virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV)

15 <220>

<223> secuencia de ADNc de la secuencia genómica completa del segmento S de LCMV

<400> 1

cgccaccgggg atcctaggct ttttgattg cgctttcctc tagatcaact ggggtgcagg	60
ccctatccta cagaaggatg ggtcagattg tgacaatggt tgaggctctg cctcacatca	120
tcgatgaggt gatcaacatt gtcattattg tgcttatcgt gatcacgggt atcaaggctg	180
tctacaatth tgccacctgt gggatattcg cattgatcag tttcctactt ctggctggca	240
ggctctgtgg catgtacggc ctttaaggac ccgacattta caaaggagtt taccaattta	300
agtcagtgga gtttgatatg tcacatctga acctgacct gcccaacgca tgttcagcca	360
acaactccca ccattacatc agtatgggga cttctggact agaattgacc ttcaccaatg	420
attccatcat cagtcacaac ttttgcaatc tgacctctgc cttcaacaaa aagacctttg	480
accacacact catgagtata gtttcgagcc tacacctcag tatcagaggg aactccaact	540
ataaggcagt atcctgcgac ttcaacaatg gcataacct ccaatacaac ttgacattct	600
cagatcgaca aagtgctcag agccagtgta gaacctcag aggtagagtc ctagatatgt	660
ttagaactgc cttcgggggg aaatacatga ggagtggctg gggctggaca ggctcagatg	720
gcaagaccac ctggtgtagc cagacgagtt accaatacct gattatacaa aatagaacct	780
gggaaaacca ctgcacatat gcaggtcctt ttgggatgtc caggattctc ctttcccaag	840
agaagactaa gttcttcact aggagactag cgggcacatt cacctggact ttgtcagact	900
cttcaggggt ggagaatcca ggtggttatt gcctgaccaa atggatgatt cttgctgcag	960
agcttaagtg tttcgggaac acagcagttg cgaaatgcaa tgtaaatcat gatgccgaat	1020
tctgtgacat gctgcgacta attgactaca acaaggctgc tttgagtaag ttcaagagg	1080

ES 2 811 093 T3

acgtagaatc tgccttgac ttattcaaaa caacagtga ttctttgatt tcagatcaac 1140
 tactgatgag gaaccacttg agagatctga tgggggtgcc atattgcaat tactcaaagt 1200
 tttggtacct agaacatgca aagaccggcg aaactagtgt cccaagtgc tggcttgtca 1260
 ccaatggttc ttacttaaat gagaccact tcagtgatca aatcgaacag gaagccgata 1320
 acatgattac agagatggtg aggaaggatt acataaagag gcaggggagt acccccctag 1380
 cattgatgga cttctgatg tttccacat ctgcatatct agtcagcatc ttctgcacc 1440
 ttgtcaaat accaacacac aggcacataa aagggtgctc atgtccaaag ccacaccgat 1500
 taaccaacaa aggaatttgt agttgtggtg catttaagggt gcctggtgta aaaaccgtct 1560
 ggaaaagacg ctgaagaaca ggcctccct gactctccac ctgaaagag gtggagagtc 1620
 agggaggccc agaggtctt agagtgtcac aacattggg cctctaaaa ttaggtcatg 1680
 tggcagaatg ttgtgaacag ttttcagatc tgggagcctt gctttggagg cgctttcaaa 1740
 aatgatgcag tccatgagtg cacagtgcgg ggtgatctct ttcttctttt tgtcccttac 1800
 tattccagta tgcactttac acaaccagcc atattgtcc cacactttgt cttcatactc 1860
 cctcgaagct tccctggtca tttcaacatc gataagctta atgtccttc tattctgtga 1920
 gtccagaagc tttctgatg catcgagcc ttgacagctt agaaccatcc cctgcggaag 1980
 agcacctata actgacgagg tcaaccggg ttgctcattg aagaggtcgg caagatccat 2040
 gccgtgtgag tacttggaa cttgcttgaa ttgttttga tcaacgggtt ccctgtaaaa 2100
 gtgtatgaac tgcccgttct gtggttgaa aattgctatt tccactggat cattaatct 2160
 accctcaatg tcaatccatg taggagcgtt ggggtcaatt cctccatga ggtctttta 2220
 aagcattgtc tggctgtagc ttaagccac ctgaggtgga cctgctgctc caggcgtgg 2280
 cctgggtgaa ttgactgcag gtttctcgct tgtgagatca attgttgtgt tttccatgc 2340
 tctcccaca atcgatgtt tacaagctat gtatggccat ccttcacctg aaaggcaaac 2400
 tttatagagg atgttttcat aagggttct gtccccact tggctgaaa caaacatgtt 2460
 gagttttctc ttggccccga gaactgcctt caagaggtcc tcgctgttgc ttggcttgat 2520
 caaaattgac tctaacatgt taccaccatc caacagggtc gccctgcct tcacggcagc 2580
 accaagacta aagttatagc cagaaatgtt gatgctggac tgctgttcag tgatgacccc 2640
 cagaactggg tgcttctctt tcagccttc aagatcatta agatttggat acttgactgt 2700
 gtaaagcaag ccaaggtctg tgagccttg tacaacgtca ttgagcggag tctgtgactg 2760
 tttggccata caagccatag ttagacttgg cattgtgcca aattgattgt tcaaaagtga 2820
 tgagtctttc acatccaaa ctcttaccac accacttgca ccctgctgag gctttctcat 2880
 cccaactatc tgtaggatct gagatctttg gtctagtgtc tgtgttgta agttcccat 2940
 atatacccct gaagcctggg gccttccaga cctcatgatc ttggccttca gcttctcaag 3000

ES 2 811 093 T3

gtcagccgca agagacatca gttcttctgc actgagcctc cccactttca aaacattctt 3060
ctttgatggt gactttaaat ccacaagaga atgtacagtc tggttgagac ttctgagtct 3120
ctgtaggtct ttgtcatctc tcttttcctt cctcatgata ctctgaacat tgctgacctc 3180
agagaagtc aaccattca gaaggttggt tgcataccta atgacagcag ccttcacatc 3240
tgatgtgaag ctctgcaatt ctcttctcaa tgcttgctgc cattggaagc tcttaacttc 3300
cttagacaag gacatcttgt tgctcaatgg tttctcaaga caaatgcgca atcaaatgcc 3360
taggatccac tgtgcg 3376

<210> 2

<211> 3377

<212> ADN

5 <213> Virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV)

<220>

<223> Secuencia completa del segmento S del Clon 13 de LCMV (GenBank: DQ361065.2)

<400> 2

gcgcacccggg gatcctaggc tttttggatt gcgctttcct ctagatcaac tgggtgtcag 60
gccctatcct acagaaggat gggtcagatt gtgacaatgt ttgaggctct gcctcacatc 120
atcgatgagg tgatcaacat tgtcattatt gtgcttatcg tgatcacggg tatcaaggct 180
gtctacaatt ttgccacctg tgggatattc gcattgatca gtttcctact tctggctggc 240
aggctctgtg gcatgtacgg tcttaaggga cccgacattt acaaaggagt ttaccaattt 300
aagtcagtgg agtttgatat gtcacatctg aacctgacca tgccaacgc atgttcagcc 360
aacaactccc accattacat cagtatgggg acttctggac tagaattgac cttaccaat 420
gattccatca tcagtcacaa cttttgcaat ctgacctctg ccttcaacaa aaagaccttt 480
gaccacacac tcatgagtat agtttcgagc ctacacctca gtatcagagg gaactccaac 540
tataaggcag tatcctgcga cttcaacaat ggcataacca tccaatacaa cttgacattc 600
tcagatgcac aaagtgtca gagccagtgt agaaccttca gaggtagagt cctagatatg 660
tttagaactg ccttcggggg gaaatacatg aggagtggct ggggctggac aggctcagat 720
ggcaagacca cctggtgtag ccagacgagt taccaatacc tgattataca aaatagaacc 780
tgggaaaacc actgcacata tgcaggtcct tttgggatgt ccaggattct cttttcccaa 840
gagaagacta agttcctcac taggagacta gcgggcacat tcacctggac tttgtcagac 900
tcttcagggg tggagaatcc aggtggttat tgcctgacca aatggatgat tcttgctgca 960
gagcttaagt gtttcgggaa cacagcagtt gcgaaatgca atgtaaatca tgatgaagaa 1020
ttctgtgaca tgctgogact aattgactac aacaaggctg ctttgagtaa gttcaaagag 1080
gacgtagaat ctgccttgca cttattcaaa acaacagtga attctttgat ttcagatcaa 1140

10

ES 2 811 093 T3

ctactgatga ggaaccactt gagagatctg atgggggtgc catattgcaa ttactcaaag 1200
ttttggtacc tagaacatgc aaagaccggc gaaactagtg tccccaaagt ctggcttgtc 1260
accaatgggtt cttacttaaa tgagaccacc ttcagtgacc aaatcgaaca ggaagccgat 1320
aacatgatta cagagatggt gaggaaggat tacataaaga ggcaggggag tcccccceta 1380
gcattgatgg accttctgat gttttccaca tctgcatatc tagtcagcat cttcctgcac 1440
cttgtcaaaa taccaacaca caggcacata aaaggtggct catgtccaaa gccacaccga 1500
ttaaccaaca aaggaatttg tagttgtggt gcatttaagg tgccctggtg aaaaaccgtc 1560
tggaaaagac gctgaagaac agcgcctccc tgactctcca cctcgaaaga ggtggagagt 1620
cagggaggcc cagagggtct tagagtgtca caacatttgg gcctctaaaa attaggtcat 1680
gtggcagaat gttgtgaaca gttttcagat ctgggagcct tgctttggag gcgctttcaa 1740
aatgatgca gtccatgagt gcacagtgcg ggggtgatctc tttcttcttt ttgtccetta 1800
ctattccagt atgcatctta cacaaccagc catatttgtc ccacactttg tcttcatact 1860
ccctcgaagc ttccctggtc atttcaacat cgataagctt aatgtccttc ctattctgtg 1920
agtccagaag ctttctgatg tcatcggagc cttgacagct tagaaccatc ccctgcggaa 1980
gagcacctat aactgacgag gtcaaccocg gttgcgcatt gaagaggtcg gcaagatcca 2040
tgccgtgtga gtacttggaa tcttgcctga attgtttttg atcaacgggt tcctctgaaa 2100
agtgtatgaa ctgcccgctt tgtggttggg aaattgctat ttccactgga tcattaaatc 2160
taccctcaat gtcaatccat gtaggagcgt tggggtcaat tcctcccatg aggtctttta 2220
aaagcattgt ctggctgtag cttagcccca cctgaggtgg acctgctgct ccaggcctg 2280
gcctgggtga attgactgca ggtttctcgc ttgtgagatc aattgttgtg ttttcccatg 2340
ctctccccac aatcgatggt ctacaagcta tgtatggcca tccttcacct gaaaggcaaa 2400
ctttatagag gatgttttca taagggttcc tgtccccaac ttggtctgaa acaaacatgt 2460
tgagttttct cttggccccg agaactgcct tcaagaggtc ctgctgttg cttggcttga 2520
tcaaaattga ctctaacatg ttaccccat ccaacagggc tgcccctgcc ttcacggcag 2580
caccaagact aaagtatatag ccagaaatgt tgatgctgga ctgctgttca gtgatgacc 2640
ccagaactgg gtgcttgtct ttcagccttt caagatcatt aagatttggg tacttgactg 2700
tgtaaagcaa gccaaagtct gtgagcgcct gtacaacgtc attgagcggg gtctgtgact 2760
gtttggccat acaagccata gttagacttg gcattgtgcc aaattgattg ttcaaaagt 2820
atgagtcttt cacatcccaa actcttacca caccacttgc accctgctga ggctttctca 2880
tccaactat ctgtaggatc tgagatcttt ggtctagttg ctgtgttgtt aagttcccca 2940
tatatacccc tgaagcctgg ggcctttcag acctcatgat cttggccttc agcttctcaa 3000
ggtcagccgc aagagacatc agttcttctg cactgagcct cccactttc aaaacattct 3060

ES 2 811 093 T3

tctttgatgt tgactttaaa tccacaagag aatgtacagt ctggttgaga cttctgagtc 3120
 tctgtaggtc tttgtcatct ctcttttcct tcctcatgat cctctgaaca ttgctgacct 3180
 cagagaagtc caaccattc agaaggttg ttgcatcctt aatgacagca gccttcacat 3240
 ctgatgtgaa gctctgcaat tctcttctca atgcttgctt ccattggaag ctottaactt 3300
 ccttagacaa ggacatcttg ttgctcaatg gtttctcaag acaaatgcgc aatcaaatgc 3360
 ctaggatcca ctgtgcg 3377

<210> 3
 <211> 7229
 <212> ADN

5 <213> Virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV)

<220>
 <223> Secuencia completa del segmento L del Clon 13 de LCMV (GenBank: DQ361066.1)

<400> 3
 gcgcaccggg gatcctaggg gtttagttgc gctgtttggg tgcacaactt tcttcgtgag 60
 gctgtcagaa gtggacctgg ctgatagcga tgggtcaagg caagtccaga gaggagaaa 120
 gcaccaatag tacaacacagg gccgaaatcc taccagatac cacctatctt ggccctttaa 180
 gctgcaaatc ttgctggcag aaatttgaca gcttggttaag atgccatgac cactaccttt 240
 gcaggcactg tttaaacctt ctgctgtcag tatccgacag gtgtcctctt tgtaaatatc 300
 cattaccaac cagattgaag atatcaacag cccaagctc tccacctccc tacgaagagt 360
 aacaccgtcc ggccccggcc ccgacaaaaca gcccagcaca aggaaccgc acgtcaccca 420
 acgcacacag acacagcacc caacacagaa cacgcacaca cacacacaca cacaccaca 480
 cgcacgcgcc cccaccaccg gggggcgccc cccccgggg ggcgcccc cgggagcccc 540
 ggcggagccc cacggagatg cccatcagtc gatgtcctcg gccaccgacc cgcccagcca 600
 atcgtcgcag gacctcccct tgagtctaaa cctgcccccc actgtttcat acatcaaagt 660
 gctcctagat ttgctaaaac aaagtctgca atccttaaag gcgaaccagt ctggcaaaaag 720
 cgacagtgga atcagcagaa tagatctgtc tatacatagt tcctggagga ttacacttat 780
 ctctgaacct acaaatggtt caccagttct gaatcagtc aggaagaggt tccaaggac 840
 atcactaatc ttttcatagc cctcaagtcc tgctagaaag actttcatgt ccttggcttc 900
 cagcttcaca atgatatttt ggacaagggt tcttccttca aaaagggcac ccatctttac 960
 agtcagtggc acaggctccc actcaggtcc aactctctca aagtcaatag atctaattccc 1020
 atccagtatt cttttggagc ccaacaactc aagctcaaga gaatcaccaa gtatcaaggg 1080
 atcttccatg taatcctcaa actcttcaga tctgatatca aagacacat cgttcacctt 1140
 gaagacagag tctgtcctca gtaagtggag gcattcatcc aacattcttc tatctatctc 1200

10

ES 2 811 093 T3

acccttaaag aggtgagagc atgataaaaag ttcagccaca cctggattct gtaattggca 1260
 cctaaccaag aatatcaatg aaaatttctt taaacagtca gtattattct gattgtgcgt 1320
 aaagtccact gaaattgaaa actccaatac cccttttggt tagttgagca tgtagtccca 1380
 cagatccttt aaggatttaa atgcctttgg gtttgtcagg ccctgcctaa tcaacatggc 1440
 agcattacac acaacatctc ccattcggta agagaaccac ccaaaaccaa actgcaaact 1500
 attcctaaac ataggcctct ccacattttt gttcaccacc tttgagacaa atgattgaaa 1560
 ggggccagc gcctcagcac catcttcaga tggcatcatt tctttatgag ggaacctga 1620
 aaaattgcct aatgtcctgg ttgttgcaac aaattctoga acaaattgatt caaaatacac 1680
 ctgttttaag aagttcttgc agacatccct cgtgctaaca acaaattcat caaccagact 1740
 ggagtcagat cgctgatgag aattggcaag gtcagaaaac agaacagtgt aatgttcatc 1800
 ccttttccac ttaacaacat gagaaatgag tgacaaggat tctgagttaa tatcaattaa 1860
 aacacagagg tcaaggaatt taattctggg actccacctc atgttttttg agctcatgtc 1920
 agacataaat ggaagaagct gatcctcaa gatcctggga tatagccgcc tcacagattg 1980
 aatcacttgg ttcaaattca ctttgcctc cagtagcctt gagctctcag gctttcttgc 2040
 tacataatca catgggttta agtgcttaag agtttagttc tcaactgtat tcttcccttt 2100
 ggtcggttct gctaggacc aaacacccaa ctcaaaagag ttgctcaatg aaatacaaat 2160
 gtagtcccaa agaagaggcc ttaaaaggca tatatgatca cgggtgggctt ctggatgaga 2220
 ctgtttgtca caaatgtaca gcgttatacc atcccattg caaactctg tcacatgatc 2280
 atctgtggtt agatcctcaa gcagcttttt gatatacaga ttttccctat ttttgtttct 2340
 cacacacctg cttcctagag ttttgcaaag gcctataaag ccagatgaga tacaactctg 2400
 gaaagctgac ttgttgattg cttctgacag cagcttctgt gcacccttg tgaatttact 2460
 acaaagtttg ttctggagtg tcttgatcaa tgatgggatt ctttctctt ggaaagtcat 2520
 cactgatgga taaaccacct tttgtcttaa aaccatcctt aatgggaaca tttcattcaa 2580
 attcaaccag ttaacatctg ctaactgatt cagatcttct tcaagaccga ggaggtctcc 2640
 caattgaaga atggcctcct ttttatctct gttaaatagg tctaagaaaa attcttcatt 2700
 aaattcacca tttttgagct tatgatgagc tttccttaca agctttctta caaccttgt 2760
 ttcattagga cacagttcct caatgagtct ttgtattctg taacctctag aaccatccag 2820
 ccaatcttct acatcagtggt tggatttcag tagaaatgga tccaaaggga aattggcata 2880
 ctttaggagg tccagtgttc tcctttggat actattaact agggagactg ggacgccatt 2940
 tgcgatggct tgatctgcaa ttgtatctat tgtttcacaa agttgatgtg gctctttaca 3000
 cttgacattg tgtagcgtg cagatacaaa ctttgtgaga agagggactt cctccccca 3060
 tacatagaat ctagatttaa attctgcagc gaacctccca gccacacttt ttgggctgat 3120

ES 2 811 093 T3

aaatttgttt aacaagccgc tcagatgaga ttggaattcc aacaggacaa ggacttcctc 3180
 cggatcactt acaaccaggt cactcagcct cctatcaaat aaagtgatct gatcatcact 3240
 tgatgtgtaa gcctctggtc tttcgccaaa gataacacca atgcagtagt tgatgaacct 3300
 ctcgctaagc aaacataga agtcagaagc attatgcaag attccctgcc ccatatcaat 3360
 aaggctggat atatgggatg gcaactatccc catttcaaaa tattgtctga aaattctctc 3420
 agtaacagtt gtttctgaac ccctgagaag ttttagcttc gacttgacat atgatttcat 3480
 cattgcattc acaacaggaa aggggacctc gacaagctta tgcatgtgcc aagttaacaa 3540
 agtgctaaca tgatctttcc cggaacgcac atactgggtca tcacctagtt tgagattttg 3600
 tagaaacatt aagaacaaaa atgggcacat cattgggtccc catttgctgt gatccatact 3660
 atagttaag aacccttccc gcacattgat agtcattgac aagattgcat tttcaaattc 3720
 cttatcattg tttaaacagc agcctgaaaa gaaacttgaa aaagactcaa aataatcttc 3780
 tattaacctt gtgaacattt ttgtcctcaa atctccaata tagagttctc tatttcccc 3840
 aacctgctct ttataagata gtgcaaattt cagccttcca gagtcaggac ctactgaggt 3900
 gtatgatggt ggtgattctt ctgagtagaa gcacagattt ttcaaagcag cactcataca 3960
 ttgtgtcaac gacagagctt tactaaggga ctcagaatta ctttccctct cactgattct 4020
 cacgtcttct tccagtttgt cccagtcaaa tttgaaattc aagccttgcc tttgcatatg 4080
 cctgtatttc cctgagtagc catttgcatt catttgcaac agaatcatct tcatgcaaga 4140
 aaaccaatca ttctcagaaa agaactttct acaaaggttt tttgccatct catcgaggcc 4200
 aactgatct ttaatgactg aggtgaaata caaaggtgac agctctgtgg aacctcaac 4260
 agcctcacag ataaatttca tgtcatcatt ggtagacat gatgggtcaa agtcttctac 4320
 taaatggaaa gatatttctg acaagataac ttttcttaag tgagccatct tccctgtag 4380
 aataagctgt aaatgatgta gtccttttgt atttgtaagt ttttctccat ctctttgtc 4440
 attggccctc ctacctcttc tgtaccgtgc tattgtggtg ttgacctttt cttcgagact 4500
 tttgaagaag cttgtctctt ctctccatc aaaacatatt tctgccaggt tgtcttccga 4560
 tctccctgtc tcttctccct tggaaccgat gaccaatcta gagactaact tggaaacttt 4620
 atattcatag tctgagtgcc tcaacttata cttttgtttt cttacgaaac tctccgtaat 4680
 ttgactcaca gcaactaaca gcaatttggt aaagtcatat tccagaagtc gttctccatt 4740
 tagatgctta ttaaccacca cacttttggt actagcaaga tctaagtctg tcgcacatcc 4800
 agagttagtc atgggatcta ggctgttag cttcttctct cctttgaaaa ttaaagtgcc 4860
 gttgttaaat gaagacacca ttaggctaaa ggcttccaga ttaacacctg gagttgtatg 4920
 ctgacagtca atttctttac tagtgaatct cttcatttgc tcatagaaca cacattcttc 4980

ES 2 811 093 T3

ctcaggagtg attgcttcct tggggttgac aaaaaaacca aattgacttt tgggctcaaa 5040
gaacttttca aaacatttta tctgatctgt tagcctgtca ggggtctcct ttgtgatcaa 5100
atgacacagg tatgacacat tcaacataaa tttaaatfff gcaactcaaca acaccttctc 5160
accagtacca aaaatagttt ttattaggaa tctaagcagc ttatacacca ccttctcagc 5220
aggtgtgatc agatcctccc tcaacttadc cattaatgat gtagatgaaa aatctgacac 5280
tattgccatc accaaatadc tgacactctg tacctgcttt tgatttctct ttgttgggtt 5340
gggtgagcatt agcaacaata ggggtcctcag tgcaacctca atgtcgggtga gacagtcttt 5400
caaatcagga catgatctaa tccatgaaat catgatgtct atcatattgt ataagacctc 5460
atctgaaaaa attggtaaaa agaactttt aggatctgca tagaaggaaa ttaaatgacc 5520
atccgggctc tgtatggagt agcaccttga agattctcca gtcttctggt ataataggtg 5580
gtattcttca gagtccagtt ttattacttg gcaaaacact tctttgcatt ctaccacttg 5640
atatctcaca gacctatftt gattttgcct tagtctagca actgagctag ttttcatact 5700
gtttgtaag gccagacaaa cagatgataa tcttctcagg ctctgtatgt tcttcagctg 5760
ctctgtgctg ggttggaaat tgtaatcttc aaacttcgta taatacatta tcgggtgagc 5820
tccaattttc ataaagtctc caaatcagt gaatggtatg tggcattctt gctcaaggtg 5880
ttcagacagt ccgtaatgct cgaactcag tcccaccact aacaggcatt tttgaatftt 5940
tgcaatgaac tcaactaatg atgccctaaa caattcctca aaagacacct ttctaaacac 6000
ctttgacttt tttctattcc tcaaaagtct aatgaactcc tctttagtgc tgtgaaagct 6060
taccagccta tcaatcacac tactatagca acaaccacc cagtgtttat cattttttaa 6120
ccctttgaat ttcgactgft ttatcaatga ggaaagacac aaaacatcca gatttaacaa 6180
ctgtctcctt ctagtattca acagtttcaa actcttgact ttgtttaaca tagagaggag 6240
cctctcatat tcagtgttag totcacttcc cctttcgtgc ccatgggtct ctgcagttat 6300
gaatctcatc aaaggacagc attcgaactc ctccctgctt aatgttaaga tatcatcact 6360
atcagcaagg ttttcataga gctcagagaa ttccttgatc aagcctcag ggtttacttt 6420
ctgaaagttt ctctttaatt tcccactttc taaatctctt ctaaacctgc tgaaaagaga 6480
gtttattcca aaaaccacat catcacagct catgttgggg ttgatgcctt cgtggcacat 6540
cctcataatt tcatcattgt gagttgacct cgcactttc agaattttca tagagtccat 6600
accggagcgc ttgtcgatag tagtcttcag ggactcacag agtctaaaa attcagactc 6660
ttcaaagact ttctcatttt ggttagaata ctccaaaagt ttgaataaaa ggtctctaaa 6720
tttgaagttt gccactctg gcataaaact attatcataa tcacaacgac catctactat 6780
tggaactaat gtgacaccgc caacagcaag gtcttccctg atgcatgcca atttgttagt 6840
gtcctctata aatttcttct caaaactggc tggagtgtct ctaacaaaac actcaagaag 6900

ES 2 811 093 T3

aatgagagaa ttgtctatca gcttgtaacc atcaggaatg ataagtggta gtcctgggca 6960
 tacaattcca gactccacca aaattgtttc cacagactta tcgtcgtggt tgtgtgtgca 7020
 gccactcttg tctgcactgt ctatttcaat gcagcgtgac agcaacttga gtcctcaat 7080
 cagaaccatt ctgggttccc tttgtcccag aaagttgagt ttctgccttg acaacctctc 7140
 atcctgttct atatagttta aacataactc tctcaattct gagatgattt catccattgc 7200
 gcatcaaaaa gcctaggatc ctcggtgcg 7229

<210> 4
 <211> 7205
 <212> ADN

5 <213> Virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV)

<220>
 <223> Secuencia completa del segmento L de la cepa M de LCMV

<400> 4
 gcgcaccggg gatcctaggc atttttgttg cgcattttgt tgtgttattt gttgcacagc 60
 ccttcatcgt gggaccttca caaacaacc aaaccaccag ccatgggcca aggcaagtcc 120
 aaagagggaa gggatgccag caatacgagc agagctgaaa ttctgccaga caccacctat 180
 ctcggacctc tgaactgcaa gtcagctgag cagagatttg acagtttagt cagatgccat 240
 gaccactatc tctgcagaca ctgcctgaac ctctgctgt cagtctccga caggtgccct 300
 ctctgcaaac atccattgcc aaccaaactg aaaatatcca cgcccccaag ctctccacc 360
 ccttacgagg agtgacgccc cgagcccca caccgacaca aggaggccac caacacaacg 420
 cccaacacgg aacacacaca cacacacca cacacacatc cacacacacg cgccccaca 480
 acgggggccc cccccgggg gtggccccc ggggtgctcg gcggagccc acggagaggc 540
 caattagtcg atctcctcga ccaccgactt ggtcagccag tcatcacagg acttgcctt 600
 aagtctgtac ttgccacaa ctgtttcata catcacctg ttctttgact tactgaaaca 660
 tagcctacag tctttgaaag tgaaccagtc aggcaagaat gacagcggta ccagtagaat 720
 ggatctatct atacacaact cttggagaat tgtgctaatt tccgaccct gtagatgctc 780
 accagttctg aatcgatgta gaagaaggct cccaaggagc tcatcaaat ttccataacc 840
 ctcgagctct gccaaagaaa ctctcatatc cttggtctcc agtttcacaa cgatgttctg 900
 aacaaggctt ctccctcaa aaagagcacc cattctcaca gtcaagggca caggctcca 960
 ttcaggcca atcctctcaa aatcaaggga tctgatccg tccagtattt tcttgagcc 1020
 tatcagctca agtcaagag agtcaccgag tatcagggg tcctccatat agtcctcaa 1080
 ctcttcagac ctaatgtcaa aaacaccatc gttcaccttg aagatagagt ctgatctcaa 1140
 caggtggagg cattcgtcca agaaccttct gtccacctca cctttaaga ggtgagagca 1200

10

ES 2 811 093 T3

tgataggaac tcagctacac ctggaccttg taactggcac ttcactaaaa agatcaatga 1260
 aaacttcctc aaacaatcag tgttattctg gttgtgagtg aaatctactg taattgagaa 1320
 ctctagcact ccctctgtat ttttatcat gtaatcccac aagtttctca aagacttgaa 1380
 tgcctttgga tttgtcaagc cttgtttgat tagcatggca gcattgcaca caatatctcc 1440
 caatcggtaa gagaaccatc caaatccaaa ttgcaagtca ttcctaaaca tgggcctctc 1500
 catatTTTTg ttcactactt ttaagatgaa tgattgaaa ggccccaatg cttcagcgcc 1560
 atcttcagat ggcacatgt ctttatgagg gaaccatgaa aaacttccta gagttctgct 1620
 tgttgctaca aattctcgta caaatgactc aaaatacact tgttttaaaa agtttttgca 1680
 gacatccctt gtactaacga caaatcatc aacaaggctt gagtcagagc gctgatggga 1740
 attacaaga tcagaaaata gaacagtgta gtgttcgtcc ctcttccact taactacatg 1800
 agaaatgagc gataaagatt ctgaattgat atcgatcaat acgcaaaggc caaggaatTT 1860
 gattctggga ctccatctca tgttttttga gctcatatca gacatgaagg gaagcagctg 1920
 atcttcatag attttagggc acaatcgcct cacagattgg attacatggt ttaaacttat 1980
 cttgtcctcc agtagccttg aactctcagg cttccttgct acataatcac atgggttcaa 2040
 gtgcttgagg cttgagcttc cctcattctt ccttttcaca ggttcagcta agaccctaac 2100
 acccaactca aaggaattac tcagtgagat gcaaatatag tcccaaagga ggggcctcaa 2160
 gagactgatg tggctcgcagt gagcttctgg atgactttgc ctgtcacaaa tgtacaacat 2220
 tatgccatca tgtctgtgga ttgctgtcac atgcgcatcc atagctagat cctcaagcac 2280
 ttttctaagt tatagattgt ccctatTTTT atttctcaca catctacttc ccaaagTTTT 2340
 gcaaagacct ataaagcctg atgagatgca actttgaaag gctgacttat tgattgcttc 2400
 tgacagcaac ttctgtgcac ctcttgtgaa cttactgcag agcttgttct ggagtgtctt 2460
 gattaatgat gggattcttt cctcttggaa agtcattact gatggataaa ccactttctg 2520
 cctcaagacc attcttaatg ggaacaactc attcaaatc agccaattta tgtttgccaa 2580
 ttgacttaga tcctcttoga ggccaaggat gtttcccaac tgaagaatgg ctctcttttt 2640
 atccctattg aagaggctca agaagaatc ttcatgaaac tcaccattct tgagcttatg 2700
 atgtagtctc cttacaagcc ttctcatgac cttcgtttca ctaggacaca attcttcaat 2760
 aagcctttgg attctgtaac ctctagagcc atccaaccaa tccttgacat cagtattagt 2820
 gttaagcaaa aatgggtcca agggaaagt ggcatatTTT aagaggctca atgttctctt 2880
 ctggatgcag tttaccaatg aaactggaac accatttga acagcttgat cggcaattgt 2940
 atctattgTT tcacagagtt ggtgtggctc tttacactta acgttgtgta atgctgctga 3000
 cacaaatTTT gttaaaagtg ggacctcttc cccccacaca taaaatctgg atttaaatc 3060
 tgcagcaaat cgccccacca cactttctcg actgatgaac ttgttaagca agccactcaa 3120

ES 2 811 093 T3

atgagaatga aattccagca atacaaggac ttctcaggg tcactatcaa ccagttcact 3180
caatctccta tcaaataagg tgatctgac atcacttgat gtgtaagatt ctggctcttc 3240
acaaaaatg acaccgatac aataattaat gaatctctca ctgattaagc cgtaaaagtc 3300
agaggcatta tgtaagattc cctgtcccat gtcaatgaga ctgcttatat gggaaggcac 3360
tattccta at tcaaaatatt ctgaaagat tctttcagtc acagttgtct ctgaaccct 3420
aagaagtttc agctttgatt tgatatatga tttcatcatt gcattcacia caggaaaagg 3480
gacctcaaca agtttgtgca tgtgccaagt taataaggty ctgatatgat cctttccgga 3540
acgcacatac tggatcatcac ccagtttgag attttgaagg agcattaaaa acaaaaatgg 3600
gcacatcatt ggccccatt tgctatgat catactgtag ttcaacaacc cctctcgcac 3660
attgatggtc attgatagaa ttgcattttc aaattctttg tcattgttta agcatgaacc 3720
tgagaagaag ctgaaaaag actcaaaata atcctctatc aatcttgtaa acatttttgt 3780
tctcaaatcc ccaatataaa gttctctggt tctcacaacc tgctctttgt atgataacgc 3840
aaacttcaac cttccggaat caggaccaac tgaagtgtat gacgttggty actcctctga 3900
gtaaaaacat aaattcttta aagcagcact catgcatttt gtcaatgata gagccttact 3960
tagagactca gaattacttt ccctttcact aattctaaca tcttcttcta gtttgcacca 4020
gtcaaaactg aaattcagac cttgtctttg catgtgcctg tatttcctg agtatgcatt 4080
tgcatcatt tgcagtagaa tcattttcat acacgaaaac caatcacct ctgaaaaaaa 4140
cttctgcag aggttttttg ccatttcatc cagaccacat tgttctttga cagctgaagt 4200
gaaatacaat ggtgacagtt ctgtagaagt ttcaatagcc tcacagataa atttcatgty 4260
atcattggty agacaagaty ggtcaaaatc ttccacaaga tgaaaagaaa tttctgataa 4320
gatgaccttc cttaaataatg ccattttacc tgacaatata gtctgaaggt gatgcaatcc 4380
tttgtatatt tcaaacacca cctcattttc cccttcattg gtcttcttgc tttttcata 4440
ccgctttatt gtggagttga ccttatcttc taaattcttg aagaaacttg tctcttcttc 4500
cccatcaaag catatgtctg ctgagtcacc ttctagtttc ccagcttctg tttctttaga 4560
gccgataacc aatctagaga ccaactttga aaccttgty tcgtaatctg agtggttcaa 4620
tttgtacttc tgctttctca tgaagctctc tgtgatctga ctcacagcac taacaagcaa 4680
tttgttaaaa tcatactcta ggagccgty cccatttaaa tgtttgttaa caaccacact 4740
tttgttgctg gcaaggtcta atgctgttgc acaccagag ttagtcatgg gatccaagct 4800
attgagcttc ttctcccctt tgaaaaatcaa agtgccattg ttgaatgagg acaccatcat 4860
gctaaaggcc tccagattga cacctggggt tgtgctgty cagtcaactt ctttccagty 4920
gaacttcttc atttggtycat aaaaaacaca ctcttctca ggggtgattg actctttagg 4980

ES 2 811 093 T3

gttaacaaag aagccaaact cacttttagg ctcaaagaat ttctcaaagc atttaatttg 5040
 atctgtcagc ctatcagggg tttcctttgt gattaaatga cacaggtatg acacattcaa 5100
 catgaacttg aactttgagc tcaacagtac cttttcacca gtcccaaaaa cagttttgat 5160
 caaaaatctg agcaatttgt acactacttt ctcagcaggt gtgatcaaat cctccttcaa 5220
 cttgtccatc aatgatgtgg atgagaagtc tgagacaatg gccatcacta aatacctaata 5280
 gttttgaacc tgtttttgat tcctcctttgt tgggttggtg agcatgagta ataatagggt 5340
 tetcaatgca atctcaacat catcaatgct gtccttcaag tcaggacatg atctgatcca 5400
 tgagatcatg gtgtcaatca tgtttgtgcaa cacttcatct gagaagattg gtaaaaagaa 5460
 cctttttggg tctgcataaa aagagattag atggccattg ggaccttcta tagaataaca 5520
 ccttgaggat tctccagtct tttgatacag caggtgatat tcctcagagt ccaattttat 5580
 cacttggcaa aatacctctt tacattccac cacttgatac cttacagagc ccaattggtt 5640
 ttgtcttaat ctagcaactg aacttgtttt catactgttt gtcaaagcta gacagacaga 5700
 tgacaatcct ttcaaactat gcatgttctt taattgttcc gtattaggct ggaaatcata 5760
 atcttcaaac tttgtataat acattatagg atgagttccg gacctcatga aattctcaaa 5820
 ctcaataaat ggtatgtggc actcatgctc aagatgttca gacagacctt agtgcccaaa 5880
 actaagtccc accactgaca agcacctttg aacttttaaa atgaactcat ttatggatgt 5940
 tctaaacaaa tcctcaagag atacctttct atacgccttt gactttctcc tgttccttag 6000
 aagtctgatg aactcttctt tgggtctatg aaagctcacc aacctatcat tcacactccc 6060
 atagcaacaa ccaaccagct gcttatcatt ttttgaccct ttgagtttag actgtttgat 6120
 caacgaagag agacacaaga catccaaatt cagtaactgt ctcttcttgg tgttcaataa 6180
 ttttaaaact ttaactttgt tcaacataga gaggagcttc tcatactcag tgctagtctc 6240
 acttctctc tcataacat gggatatctg tgtgataaat ctcatcaaag gacaggatcc 6300
 aactgcctcc ttgcttagtg ctgaaatgct atcactgtca gcaagagtct cataaagctc 6360
 agagaattcc ttaattaaat ttccggggtt gattttctga aaactcctct tgagcttccc 6420
 agtttccaag tctcttctaa acctgctgta aagggagttt atgccaagaa ccacatcatc 6480
 gcagttcatg tttgggttga caccatcatg gcacattttc ataatttcat cattgtgaaa 6540
 tgatcttgca tctttcaaga ttttcataga gtctataacc gaacgcttat caacagtggg 6600
 cttgagagat tcgcaaagtc tgaagtactc agattcctca aagactttct catcttggct 6660
 agaatactct aaaagttaa acagaaggtc tctgaacttg aaattcacc actctggcat 6720
 aaagctgta tcataatcac accgaccatc cactattggg accaatgtga taccgcaat 6780
 ggcaaggtct tctttgatac aggttagttt attggtgtcc tctataaatt tcttctcaaa 6840
 actagctggg gtgcttctaa cgaagcactc aagaagaatg agggaattgt caatcagttt 6900

ES 2 811 093 T3

ataaccatca ggaatgatca aaggcagtcc cgggcacaca atcccagact ctattagaat 6960
 tgcctcaaca gatttatcat catgggttg tgatgcagccg ctcttgtag cactgtctat 7020
 ctctatacaa cgcgacaaaa gtttgagtcc ctctatcaat accattctgg gttctctttg 7080
 ccctaaaaag ttgagcttct gccttgacaa cctctcatct tgttctatgt ggtttaagca 7140
 caactctctc aactccgaaa tagcctcatc cattgcgcat caaaaagcct aggatcctcg 7200
 gtgcg 7205

<210> 5
 <211> 3359
 <212> ADN

5 <213> Virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV)

<220>
 <223> Secuencia completa del segmento S de la cepa MP de LCMV

<400> 5
 cgcaccgggg atcctaggct ttttgattg cgctttctc agctccgtct tgtgggagaa 60
 tgggtcaaat tgtgacgatg tttgaggctc tgcctcacat cattgatgag gtcattaaca 120
 ttgtcattat cgtgcttatt atcatcacga gcatcaaagc tgtgtacaat ttcgccacct 180
 gcgggatact tgcattgatc agctttcttt ttctggctgg caggtcctgt ggaatgatg 240
 gtcttgatgg gcctgacatt taaaaagggg tttaccgatt caagtcagtg gagtttgaca 300
 tgtcttacct taacctgacg atgcccaatg catgttcggc aaacaactcc catcattata 360
 taagtatggg gacttctgga ttggagttaa ccttcacaaa tgactccatc atcaccaca 420
 acttttgtaa tctgacttcc gccctcaaca agaggacttt tgaccacaca cttatgagta 480
 tagtctcaag tctgcacctc agcattagag gggccccag ctacaaagca gtgtcctgtg 540
 attttaacaa tggcatcact attcaatata acctgtcatt ttctaatagca cagagcgctc 600
 tgagtcaatg taagaccttc agggggagag tcctggatat gttcagaact gcttttgag 660
 gaaagtacat gaggagtggc tggggctgga caggttcaga tggcaagact acttggtgca 720
 gccagacaaa ctaccaatat ctgattatac aaaacaggac ttgggaaaac cactgcaggt 780
 acgcaggccc tttcggaatg tctagaattc tcttcgctca agaaaagaca aggtttctaa 840
 ctagaaggct tgcaaggaca ttcacttggc ctttatcaga ctcatcagga gtggagaatc 900
 caggtgggta ctgcttgacc aagtggatga tcctcgctgc agagctcaag tgttttggga 960
 acacagctgt tgcaaagtgc aatgtaaata atgatgaaga gttctgtgat atgctacgac 1020
 tgattgatta caacaaggct gctttgagta aattcaaaga agatgtagaa tccgctctac 1080
 atctgttcaa gacaacagtg aattctttga tttctgatca gcttttgatg agaaatcacc 1140
 taagagactt gatgggagtg ccatactgca attactcgaa attctggtat ctagagcatg 1200

10

ES 2 811 093 T3

caaagactgg tgagactagt gtccccaagt gctggcttgt cagcaatggt tcttatttga 1260
 atgaaaccca tttcagcgac caaattgagc aggaagcaga taatatgata acagaaatgc 1320
 tgagaaagga ctacataaaa aggcaagga gtaccctctc agccttgatg gatctattga 1380
 tgttttctac atcagcatat ttgatcagca tctttctgca tcttgtgagg ataccaacac 1440
 acagacacat aaagggcggc tcatgccaa aaccacatcg gtaaccagc aagggatct 1500
 gtagtgtggt tgcatttaaa gtaccagggtg tggaaaccac ctggaaaaga cgctgaacag 1560
 cagcgctcc ctgactcacc acctcgaaag aggtggtgag tcagggaggc ccagagggtc 1620
 ttagagtgtt acgacatttg gacctctgaa gattaggtca tgtggtagga tattgtggac 1680
 agttttcagg tcggggagcc ttgccttggg ggcgctttca aagatgatac agtccatgag 1740
 tgcacagtgt ggggtgacct ctttcttttt cttgtccctc actattccag tgtgcatctt 1800
 gcatagccag ccataattgt ccagacttt gtccctcatat tctcttgaag cttctttagt 1860
 catctcaaca tcgatgagct taatgtctct tctgttttgt gaatctagga gtttcctgat 1920
 gtcacatgat ccctgacaac ttaggacct tccctgtgga agagcaccta ttactgaaga 1980
 tgtcagccca ggttgtgcat tgaagaggtc agcaaggctc atgccatgtg agtatttggg 2040
 gtcctgcttg aattgttttt gatcagtggt ttctctatag aaatgtatgt actgccatt 2100
 ctgtggctga aatattgcta tttctaccgg gtcattaaat ctgccctcaa tgtcaatcca 2160
 tgtaggagcg ttagggtaa tacctccat gaggtccttc agcaacattg tttggctgta 2220
 gcttaagccc acctgagggtg ggcccgtgc ccagggcgt ggtttgggtg agttggccat 2280
 aggcctctca tttgtcagat caattgttgt gttctccat gctctcccta caactgatgt 2340
 tctacaagct atgtatggcc accctcccc tgaagacag actttgtaga ggatgttctc 2400
 gtaaggattc ctgtctccaa cctgatcaga aacaaacatg ttgagtttct tcttggcccc 2460
 aagaactgct ttcaggagat cctcactgtt gcttggctta attaagatgg attccaacat 2520
 gttaccccca tctaacaagg ctgccctgc tttcacagca gcaccgagac tgaattgta 2580
 gccagatag ttgatgctag actgctgctc agtgatgact cccaagactg ggtgcttctc 2640
 tttcagcctt tcaaggtcac ttaggttcgg gtacttgact gtgtaaagca gcccaaggtc 2700
 tgtgagtgtc tgcacaacgt cattgagtga ggtttgtgat tgtttggcca tacaagccat 2760
 tgttaagcct ggcattgtgc cgaattgatt gttcagaagt gatgagtcct tcacatccca 2820
 gacctcacc acaccatttg cactctgctg aggtctctc attccaacca tttgcagaat 2880
 ctgagatctt tggcaagct gttgtgctgt taagttcccc atgtagactc cagaagttag 2940
 aggcctttca gacctcatga ttttagcctt cagtttttca aggtcagctg caagggacat 3000
 cagttcttct gcactaagcc tccctacttt tagaacattc ttttttgatg ttgactttag 3060
 gtccacaagg gaatacacag tttggttgag gcttctgagt ctctgtaaat ctttgtcatc 3120
 cctcttctct ttcctcatga tcctctgaac attgctcacc tcagagaagt ctaatccatt 3180
 cagaaggctg gtggcatcct tgatcacagc agctttcaca tctgatgtga agccttgaag 3240
 ctctctctc aatgcctggg tccattgaaa gcttttaact tctttggaca gagacatttt 3300
 gtcaactcagt ggatttccaa gtcaaatgcg caatcaaat gcctaggatc cactgtgcg 3359

<210> 6

5 <211> 552

ES 2 811 093 T3

<212> PRT

<213> Virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV)

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la proteína NP de la cepa MP de LCMV

5

<400> 6

Met Ser Leu Ser Lys Glu Val Lys Ser Phe Gln Trp Thr Gln Ala Leu
1 5 10 15

Arg Arg Glu Leu Gln Gly Phe Thr Ser Asp Val Lys Ala Ala Val Ile
20 25 30

Lys Asp Ala Thr Ser Leu Leu Asn Gly Leu Asp Phe Ser Glu Val Ser
35 40 45

Asn Val Gln Arg Ile Met Arg Lys Glu Lys Arg Asp Asp Lys Asp Leu
50 55 60

Gln Arg Leu Arg Ser Leu Asn Gln Thr Val Tyr Ser Leu Val Asp Leu
65 70 75 80

Lys Ser Thr Ser Lys Lys Asn Val Leu Lys Val Gly Arg Leu Ser Ala
85 90 95

Glu Glu Leu Met Ser Leu Ala Ala Asp Leu Glu Lys Leu Lys Ala Lys
100 105 110

Ile Met Arg Ser Glu Arg Pro Leu Thr Ser Gly Val Tyr Met Gly Asn
115 120 125

Leu Thr Ala Gln Gln Leu Asp Gln Arg Ser Gln Ile Leu Gln Met Val
130 135 140

Gly Met Arg Arg Pro Gln Gln Ser Ala Asn Gly Val Val Arg Val Trp
145 150 155 160

Asp Val Lys Asp Ser Ser Leu Leu Asn Asn Gln Phe Gly Thr Met Pro
165 170 175

ES 2 811 093 T3

Ser Leu Thr Met Ala Cys Met Ala Lys Gln Ser Gln Thr Ser Leu Asn
 180 185 190

Asp Val Val Gln Ala Leu Thr Asp Leu Gly Leu Leu Tyr Thr Val Lys
 195 200 205

Tyr Pro Asn Leu Ser Asp Leu Glu Arg Leu Lys Asp Lys His Pro Val
 210 215 220

Leu Gly Val Ile Thr Glu Gln Gln Ser Ser Ile Asn Ile Ser Gly Tyr
 225 230 235 240

Asn Phe Ser Leu Gly Ala Ala Val Lys Ala Gly Ala Ala Leu Leu Asp
 245 250 255

Gly Gly Asn Met Leu Glu Ser Ile Leu Ile Lys Pro Ser Asn Ser Glu
 260 265 270

Asp Leu Leu Lys Ala Val Leu Gly Ala Lys Lys Lys Leu Asn Met Phe
 275 280 285

Asp Arg Asn Pro Tyr Glu Asn Ile Leu Tyr Lys Val Cys Leu Ser Gly
 290 295 300

Glu Gly Trp Pro Tyr Ile Ala Cys Arg Thr Ser Val Val Gly Arg Ala
 305 310 315 320

Trp Glu Asn Thr Thr Ile Asp Leu Thr Asn Glu Arg Pro Met Ala Asn
 325 330 335

Ser Pro Lys Pro Ala Pro Gly Ala Ala Gly Pro Pro Gln Val Gly Leu
 340 345 350

Ser Tyr Ser Gln Thr Met Leu Leu Lys Asp Leu Met Gly Gly Ile Asp
 355 360 365

Pro Asn Ala Pro Thr Trp Ile Asp Ile Glu Gly Arg Phe Asn Asp Pro
 370 375 380

Val Glu Ile Ala Ile Phe Gln Pro Gln Asn Gly Gln Tyr Ile His Phe
 385 390 395 400

Tyr Arg Glu Pro Thr Asp Gln Lys Gln Phe Lys Gln Asp Ser Lys Tyr
 405 410 415

Ser His Gly Met Asp Leu Ala Asp Leu Phe Asn Ala Gln Pro Gly Leu
 420 425 430

ES 2 811 093 T3

Thr Ser Ser Val Ile Gly Ala Leu Pro Gln Gly Met Val Leu Ser Cys
 435 440 445

Gln Gly Ser Asp Asp Ile Arg Lys Leu Leu Asp Ser Gln Asn Arg Arg
 450 455 460

Asp Ile Lys Leu Ile Asp Val Glu Met Thr Lys Glu Ala Ser Arg Glu
 465 470 475 480

Tyr Glu Asp Lys Val Trp Asp Lys Tyr Gly Trp Leu Cys Lys Met His
 485 490 495

Thr Gly Ile Val Arg Asp Lys Lys Lys Lys Glu Val Thr Pro His Cys
 500 505 510

Ala Leu Met Asp Cys Ile Ile Phe Glu Ser Ala Ser Lys Ala Arg Leu
 515 520 525

Pro Asp Leu Lys Thr Val His Asn Ile Leu Pro His Asp Leu Ile Phe
 530 535 540

Arg Gly Pro Asn Val Val Thr Leu
 545 550

<210> 7

<211> 498

<212> PRT

5 <213> Virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV)

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la proteína GP de la cepa MP de LCMV

<400> 7

Met Gly Gln Ile Val Thr Met Phe Glu Ala Leu Pro His Ile Ile Asp
 1 5 10 15

Glu Val Ile Asn Ile Val Ile Ile Val Leu Ile Ile Ile Thr Ser Ile
 20 25 30

Lys Ala Val Tyr Asn Phe Ala Thr Cys Gly Ile Leu Ala Leu Ile Ser
 35 40 45

Phe Leu Phe Leu Ala Gly Arg Ser Cys Gly Met Tyr Gly Leu Asp Gly
 50 55 60

Pro Asp Ile Tyr Lys Gly Val Tyr Arg Phe Lys Ser Val Glu Phe Asp
 65 70 75 80

10

ES 2 811 093 T3

Met Ser Tyr Leu Asn Leu Thr Met Pro Asn Ala Cys Ser Ala Asn Asn
85 90 95

Ser His His Tyr Ile Ser Met Gly Thr Ser Gly Leu Glu Leu Thr Phe
100 105 110

Thr Asn Asp Ser Ile Ile Thr His Asn Phe Cys Asn Leu Thr Ser Ala
115 120 125

Leu Asn Lys Arg Thr Phe Asp His Thr Leu Met Ser Ile Val Ser Ser
130 135 140

Leu His Leu Ser Ile Arg Gly Val Pro Ser Tyr Lys Ala Val Ser Cys
145 150 155 160

Asp Phe Asn Asn Gly Ile Thr Ile Gln Tyr Asn Leu Ser Phe Ser Asn
165 170 175

Ala Gln Ser Ala Leu Ser Gln Cys Lys Thr Phe Arg Gly Arg Val Leu
180 185 190

Asp Met Phe Arg Thr Ala Phe Gly Gly Lys Tyr Met Arg Ser Gly Trp
195 200 205

Gly Trp Thr Gly Ser Asp Gly Lys Thr Thr Trp Cys Ser Gln Thr Asn
210 215 220

Tyr Gln Tyr Leu Ile Ile Gln Asn Arg Thr Trp Glu Asn His Cys Arg
225 230 235 240

Tyr Ala Gly Pro Phe Gly Met Ser Arg Ile Leu Phe Ala Gln Glu Lys
245 250 255

Thr Arg Phe Leu Thr Arg Arg Leu Ala Gly Thr Phe Thr Trp Thr Leu
260 265 270

Ser Asp Ser Ser Gly Val Glu Asn Pro Gly Gly Tyr Cys Leu Thr Lys
275 280 285

Trp Met Ile Leu Ala Ala Glu Leu Lys Cys Phe Gly Asn Thr Ala Val
290 295 300

Ala Lys Cys Asn Val Asn His Asp Glu Glu Phe Cys Asp Met Leu Arg
305 310 315 320

Leu Ile Asp Tyr Asn Lys Ala Ala Leu Ser Lys Phe Lys Glu Asp Val
325 330 335

ES 2 811 093 T3

Glu Ser Ala Leu His Leu Phe Lys Thr Thr Val Asn Ser Leu Ile Ser
 340 345 350

Asp Gln Leu Leu Met Arg Asn His Leu Arg Asp Leu Met Gly Val Pro
 355 360 365

Tyr Cys Asn Tyr Ser Lys Phe Trp Tyr Leu Glu His Ala Lys Thr Gly
 370 375 380

Glu Thr Ser Val Pro Lys Cys Trp Leu Val Ser Asn Gly Ser Tyr Leu
 385 390 395 400

Asn Glu Thr His Phe Ser Asp Gln Ile Glu Gln Glu Ala Asp Asn Met
 405 410 415

Ile Thr Glu Met Leu Arg Lys Asp Tyr Ile Lys Arg Gln Gly Ser Thr
 420 425 430

Pro Leu Ala Leu Met Asp Leu Leu Met Phe Ser Thr Ser Ala Tyr Leu
 435 440 445

Ile Ser Ile Phe Leu His Leu Val Arg Ile Pro Thr His Arg His Ile
 450 455 460

Lys Gly Gly Ser Cys Pro Lys Pro His Arg Leu Thr Ser Lys Gly Ile
 465 470 475 480

Cys Ser Cys Gly Ala Phe Lys Val Pro Gly Val Glu Thr Thr Trp Lys
 485 490 495

Arg Arg

<210> 8

<211> 2201

<212> PRT

5 <213> Virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV)

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la proteína L de la cepa MP de LCMV

<400> 8

Met Asp Glu Ala Ile Ser Glu Leu Arg Glu Leu Cys Leu Asn His Ile
 1 5 10 15

Glu Gln Asp Glu Arg Leu Ser Arg Gln Lys Leu Asn Phe Leu Gly Gln
 20 25 30

10

ES 2 811 093 T3

Arg Glu Pro Arg Met Val Leu Ile Glu Gly Leu Lys Leu Leu Ser Arg
 35 40 45
 Cys Ile Glu Ile Asp Ser Ala Asp Lys Ser Gly Cys Ile His Asn His
 50 55 60
 Asp Asp Lys Ser Val Glu Ala Ile Leu Ile Glu Ser Gly Ile Val Cys
 65 70 75 80
 Pro Gly Leu Pro Leu Ile Ile Pro Asp Gly Tyr Lys Leu Ile Asp Asn
 85 90 95
 Ser Leu Ile Leu Leu Glu Cys Phe Val Arg Ser Thr Pro Ala Ser Phe
 100 105 110
 Glu Lys Lys Phe Ile Glu Asp Thr Asn Lys Leu Ala Cys Ile Lys Glu
 115 120 125
 Asp Leu Ala Ile Ala Gly Ile Thr Leu Val Pro Ile Val Asp Gly Arg
 130 135 140
 Cys Asp Tyr Asp Asn Ser Phe Met Pro Glu Trp Val Asn Phe Lys Phe
 145 150 155 160
 Arg Asp Leu Leu Phe Lys Leu Leu Glu Tyr Ser Ser Gln Asp Glu Lys
 165 170 175
 Val Phe Glu Glu Ser Glu Tyr Phe Arg Leu Cys Glu Ser Leu Lys Thr
 180 185 190
 Thr Val Asp Lys Arg Ser Gly Ile Asp Ser Met Lys Ile Leu Lys Asp
 195 200 205
 Ala Arg Ser Phe His Asn Asp Glu Ile Met Lys Met Cys His Asp Gly
 210 215 220
 Val Asn Pro Asn Met Asn Cys Asp Asp Val Val Leu Gly Ile Asn Ser
 225 230 235 240
 Leu Tyr Ser Arg Phe Arg Arg Asp Leu Glu Thr Gly Lys Leu Lys Arg
 245 250 255
 Ser Phe Gln Lys Ile Asn Pro Gly Asn Leu Ile Lys Glu Phe Ser Glu
 260 265 270
 Leu Tyr Glu Thr Leu Ala Asp Ser Asp Asp Ile Ser Ala Leu Ser Lys
 275 280 285

ES 2 811 093 T3

Glu Ala Val Glu Ser Cys Pro Leu Met Arg Phe Ile Thr Ala Asp Thr
 290 295 300
 His Gly Tyr Glu Arg Gly Ser Glu Thr Ser Thr Glu Tyr Glu Arg Leu
 305 310 315 320
 Leu Ser Met Leu Asn Lys Val Lys Ser Leu Lys Leu Leu Asn Thr Arg
 325 330 335
 Arg Arg Gln Leu Leu Asn Leu Asp Val Leu Cys Leu Ser Ser Leu Ile
 340 345 350
 Lys Gln Ser Lys Leu Lys Gly Ser Lys Asn Asp Lys His Trp Val Gly
 355 360 365
 Cys Cys Tyr Gly Ser Val Asn Asp Arg Leu Val Ser Phe His Ser Thr
 370 375 380
 Lys Glu Glu Phe Ile Arg Leu Leu Arg Asn Arg Arg Lys Ser Lys Ala
 385 390 395 400
 Tyr Arg Lys Val Ser Leu Glu Asp Leu Phe Arg Thr Ser Ile Asn Glu
 405 410 415
 Phe Ile Leu Lys Val Gln Arg Cys Leu Ser Val Val Gly Leu Ser Phe
 420 425 430
 Gly His Tyr Gly Leu Ser Glu His Leu Glu His Glu Cys His Ile Pro
 435 440 445
 Phe Ile Glu Phe Glu Asn Phe Met Arg Ser Gly Thr His Pro Ile Met
 450 455 460
 Tyr Tyr Thr Lys Phe Glu Asp Tyr Asp Phe Gln Pro Asn Thr Glu Gln
 465 470 475 480
 Leu Arg Asn Met His Ser Leu Lys Arg Leu Ser Ser Val Cys Leu Ala
 485 490 495
 Leu Thr Asn Ser Met Lys Thr Ser Ser Val Ala Arg Leu Arg Gln Asn
 500 505 510
 Gln Leu Gly Ser Val Arg Tyr Gln Val Val Glu Cys Lys Glu Val Phe
 515 520 525
 Cys Gln Val Ile Lys Leu Asp Ser Glu Glu Tyr His Leu Leu Tyr Gln

ES 2 811 093 T3

Asn Ser Leu Asp Pro Met Thr Asn Ser Gly Cys Ala Thr Ala Leu Asp
 785 790 795 800

 Leu Ala Ser Asn Lys Ser Val Val Val Asn Lys His Leu Asn Gly Glu
 805 810 815

 Arg Leu Leu Glu Tyr Asp Phe Asn Lys Leu Leu Val Ser Ala Val Ser
 820 825 830

 Gln Ile Thr Glu Ser Phe Met Arg Lys Gln Lys Tyr Lys Leu Asn His
 835 840 845

 Ser Asp Tyr Glu Tyr Lys Val Ser Lys Leu Val Ser Arg Leu Val Ile
 850 855 860

 Gly Ser Lys Glu Thr Glu Ala Gly Lys Leu Glu Gly Asp Ser Ala Asp
 865 870 875 880

 Ile Cys Phe Asp Gly Glu Glu Glu Thr Ser Phe Phe Lys Asn Leu Glu
 885 890 895

 Asp Lys Val Asn Ser Thr Ile Lys Arg Tyr Glu Arg Ser Lys Lys Thr
 900 905 910

 Asn Glu Gly Glu Asn Glu Val Gly Phe Glu Asn Thr Lys Gly Leu His
 915 920 925

 His Leu Gln Thr Ile Leu Ser Gly Lys Met Ala Tyr Leu Arg Lys Val
 930 935 940

 Ile Leu Ser Glu Ile Ser Phe His Leu Val Glu Asp Phe Asp Pro Ser
 945 950 955 960

 Cys Leu Thr Asn Asp Asp Met Lys Phe Ile Cys Glu Ala Ile Glu Thr
 965 970 975

 Ser Thr Glu Leu Ser Pro Leu Tyr Phe Thr Ser Ala Val Lys Glu Gln
 980 985 990

 Cys Gly Leu Asp Glu Met Ala Lys Asn Leu Cys Arg Lys Phe Phe Ser
 995 1000 1005

 Glu Gly Asp Trp Phe Ser Cys Met Lys Met Ile Leu Leu Gln Met
 1010 1015 1020

 Asn Ala Asn Ala Tyr Ser Gly Lys Tyr Arg His Met Gln Arg Gln
 1025 1030 1035

ES 2 811 093 T3

Gly Leu Asn Phe Lys Phe Asp Trp Asp Lys Leu Glu Glu Asp Val
 1040 1045 1050

Arg Ile Ser Glu Arg Glu Ser Asn Ser Glu Ser Leu Ser Lys Ala
 1055 1060 1065

Leu Ser Leu Thr Lys Cys Met Ser Ala Ala Leu Lys Asn Leu Cys
 1070 1075 1080

Phe Tyr Ser Glu Glu Ser Pro Thr Ser Tyr Thr Ser Val Gly Pro
 1085 1090 1095

Asp Ser Gly Arg Leu Lys Phe Ala Leu Ser Tyr Lys Glu Gln Val
 1100 1105 1110

Gly Gly Asn Arg Glu Leu Tyr Ile Gly Asp Leu Arg Thr Lys Met
 1115 1120 1125

Phe Thr Arg Leu Ile Glu Asp Tyr Phe Glu Ser Phe Ser Ser Phe
 1130 1135 1140

Phe Ser Gly Ser Cys Leu Asn Asn Asp Lys Glu Phe Glu Asn Ala
 1145 1150 1155

Ile Leu Ser Met Thr Ile Asn Val Arg Glu Gly Leu Leu Asn Tyr
 1160 1165 1170

Ser Met Asp His Ser Lys Trp Gly Pro Met Met Cys Pro Phe Leu
 1175 1180 1185

Phe Leu Met Leu Leu Gln Asn Leu Lys Asp Asp Gln Tyr Val Arg
 1190 1195 1200

Ser Gly Lys Asp His Ile Ser Thr Leu Leu Thr Trp His Met His
 1205 1210 1215

Lys Leu Val Glu Val Pro Phe Pro Val Val Asn Ala Met Met Lys
 1220 1225 1230

Ser Tyr Ile Lys Ser Lys Leu Lys Leu Leu Arg Gly Ser Glu Thr
 1235 1240 1245

Thr Val Thr Glu Arg Ile Phe Arg Glu Tyr Phe Glu Leu Gly Ile
 1250 1255 1260

Val Pro Ser His Ile Ser Ser Leu Ile Asp Met Gly Gln Gly Ile
 1265 1270 1275

ES 2 811 093 T3

Leu His Asn Ala Ser Asp Phe Tyr Gly Leu Ile Ser Glu Arg Phe
 1280 1285 1290

 Ile Asn Tyr Cys Ile Gly Val Ile Phe Gly Glu Arg Pro Glu Ser
 1295 1300 1305

 Tyr Thr Ser Ser Asp Asp Gln Ile Thr Leu Phe Asp Arg Arg Leu
 1310 1315 1320

 Ser Glu Leu Val Asp Ser Asp Pro Glu Glu Val Leu Val Leu Leu
 1325 1330 1335

 Glu Phe His Ser His Leu Ser Gly Leu Leu Asn Lys Phe Ile Ser
 1340 1345 1350

 Pro Lys Ser Val Val Gly Arg Phe Ala Ala Glu Phe Lys Ser Arg
 1355 1360 1365

 Phe Tyr Val Trp Gly Glu Glu Val Pro Leu Leu Thr Lys Phe Val
 1370 1375 1380

 Ser Ala Ala Leu His Asn Val Lys Cys Lys Glu Pro His Gln Leu
 1385 1390 1395

 Cys Glu Thr Ile Asp Thr Ile Ala Asp Gln Ala Val Ala Asn Gly
 1400 1405 1410

 Val Pro Val Ser Leu Val Asn Cys Ile Gln Lys Arg Thr Leu Asp
 1415 1420 1425

 Leu Leu Lys Tyr Ala Asn Phe Pro Leu Asp Pro Phe Leu Leu Asn
 1430 1435 1440

 Thr Asn Thr Asp Val Lys Asp Trp Leu Asp Gly Ser Arg Gly Tyr
 1445 1450 1455

 Arg Ile Gln Arg Leu Ile Glu Glu Leu Cys Pro Ser Glu Thr Lys
 1460 1465 1470

 Val Met Arg Arg Leu Val Arg Arg Leu His His Lys Leu Lys Asn
 1475 1480 1485

 Gly Glu Phe Asn Glu Glu Phe Phe Leu Asp Leu Phe Asn Arg Asp
 1490 1495 1500

 Lys Lys Glu Ala Ile Leu Gln Leu Gly Asn Ile Leu Gly Leu Glu

ES 2 811 093 T3

1505						1510									1515
Glu Asp	Leu Ser	Gln Leu	Ala Asn	Ile Asn	Trp Leu	Asn Leu	Asn Leu	Asn							
1520			1525			1530									
Glu Leu	Phe Pro	Leu Arg	Met Val	Leu Arg	Gln Lys	Val Val	Val Tyr								
1535			1540			1545									
Pro Ser	Val Met	Thr Phe	Gln Glu	Glu Arg	Ile Pro	Ser Leu	Ile								
1550			1555			1560									
Lys Thr	Leu Gln	Asn Lys	Leu Cys	Ser Lys	Phe Thr	Arg Gly	Ala								
1565			1570			1575									
Gln Lys	Leu Leu	Ser Glu	Ala Ile	Asn Lys	Ser Ala	Phe Gln	Ser								
1580			1585			1590									
Cys Ile	Ser Ser	Gly Phe	Ile Gly	Leu Cys	Lys Thr	Leu Gly	Ser								
1595			1600			1605									
Arg Cys	Val Arg	Asn Lys	Asn Arg	Asp Asn	Leu Tyr	Ile Arg	Lys								
1610			1615			1620									
Val Leu	Glu Asp	Leu Ala	Met Asp	Ala His	Val Thr	Ala Ile	His								
1625			1630			1635									
Arg His	Asp Gly	Ile Met	Leu Tyr	Ile Cys	Asp Arg	Gln Ser	His								
1640			1645			1650									
Pro Glu	Ala His	Cys Asp	His Ile	Ser Leu	Leu Arg	Pro Leu	Leu								
1655			1660			1665									
Trp Asp	Tyr Ile	Cys Ile	Ser Leu	Ser Asn	Ser Phe	Glu Leu	Gly								
1670			1675			1680									
Val Trp	Val Leu	Ala Glu	Pro Val	Lys Gly	Lys Asn	Glu Gly	Ser								
1685			1690			1695									
Ser Ser	Leu Lys	His Leu	Asn Pro	Cys Asp	Tyr Val	Ala Arg	Lys								
1700			1705			1710									
Pro Glu	Ser Ser	Arg Leu	Leu Glu	Asp Lys	Ile Ser	Leu Asn	His								
1715			1720			1725									
Val Ile	Gln Ser	Val Arg	Arg Leu	Tyr Pro	Lys Ile	Tyr Glu	Asp								
1730			1735			1740									

ES 2 811 093 T3

Gln Leu Leu Pro Phe Met Ser Asp Met Ser Ser Lys Asn Met Arg
 1745 1750 1755

Trp Ser Pro Arg Ile Lys Phe Leu Asp Leu Cys Val Leu Ile Asp
 1760 1765 1770

Ile Asn Ser Glu Ser Leu Ser Leu Ile Ser His Val Val Lys Trp
 1775 1780 1785

Lys Arg Asp Glu His Tyr Thr Val Leu Phe Ser Asp Leu Val Asn
 1790 1795 1800

Ser His Gln Arg Ser Asp Ser Ser Leu Val Asp Glu Phe Val Val
 1805 1810 1815

Ser Thr Arg Asp Val Cys Lys Asn Phe Leu Lys Gln Val Tyr Phe
 1820 1825 1830

Glu Ser Phe Val Arg Glu Phe Val Ala Thr Ser Arg Thr Leu Gly
 1835 1840 1845

Ser Phe Ser Trp Phe Pro His Lys Asp Met Met Pro Ser Glu Asp
 1850 1855 1860

Gly Ala Glu Ala Leu Gly Pro Phe Gln Ser Phe Ile Leu Lys Val
 1865 1870 1875

Val Asn Lys Asn Met Glu Arg Pro Met Phe Arg Asn Asp Leu Gln
 1880 1885 1890

Phe Gly Phe Gly Trp Phe Ser Tyr Arg Leu Gly Asp Ile Val Cys
 1895 1900 1905

Asn Ala Ala Met Leu Ile Lys Gln Gly Leu Thr Asn Pro Lys Ala
 1910 1915 1920

Phe Lys Ser Leu Arg Asn Leu Trp Asp Tyr Met Ile Asn Asn Thr
 1925 1930 1935

Glu Gly Val Leu Glu Phe Ser Ile Thr Val Asp Phe Thr His Asn
 1940 1945 1950

Gln Asn Asn Thr Asp Cys Leu Arg Lys Phe Ser Leu Ile Phe Leu
 1955 1960 1965

Val Lys Cys Gln Leu Gln Gly Pro Gly Val Ala Glu Phe Leu Ser
 1970 1975 1980

ES 2 811 093 T3

Cys Ser His Leu Phe Lys Gly Glu Val Asp Arg Arg Phe Leu Asp
 1985 1990 1995

Glu Cys Leu His Leu Leu Arg Ser Asp Ser Ile Phe Lys Val Asn
 2000 2005 2010

Asp Gly Val Phe Asp Ile Arg Ser Glu Glu Phe Glu Asp Tyr Met
 2015 2020 2025

Glu Asp Pro Leu Ile Leu Gly Asp Ser Leu Glu Leu Glu Leu Ile
 2030 2035 2040

Gly Ser Arg Lys Ile Leu Asp Gly Ile Arg Ser Leu Asp Phe Glu
 2045 2050 2055

Arg Ile Gly Pro Glu Trp Glu Pro Val Pro Leu Thr Val Arg Met
 2060 2065 2070

Gly Ala Leu Phe Glu Gly Arg Ser Leu Val Gln Asn Ile Val Val
 2075 2080 2085

Lys Leu Glu Thr Lys Asp Met Arg Val Phe Leu Ala Glu Leu Glu
 2090 2095 2100

Gly Tyr Gly Asn Phe Asp Asp Val Leu Gly Ser Leu Leu Leu His
 2105 2110 2115

Arg Phe Arg Thr Gly Glu His Leu Gln Gly Ser Glu Ile Ser Thr
 2120 2125 2130

Ile Leu Gln Glu Leu Cys Ile Asp Arg Ser Ile Leu Leu Val Pro
 2135 2140 2145

Leu Ser Leu Val Pro Asp Trp Phe Thr Phe Lys Asp Cys Arg Leu
 2150 2155 2160

Cys Phe Ser Lys Ser Lys Asn Thr Val Met Tyr Glu Thr Val Val
 2165 2170 2175

Gly Lys Tyr Arg Leu Lys Gly Lys Ser Cys Asp Asp Trp Leu Thr
 2180 2185 2190

Lys Ser Val Val Glu Glu Ile Asp
 2195 2200

<210> 9

<211> 90

<212> PRT

5 <213> Virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV)

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de la proteína Z de la cepa MP de LCMV

ES 2 811 093 T3

<400> 9

Met Gly Gln Gly Lys Ser Lys Glu Gly Arg Asp Ala Ser Asn Thr Ser
1 5 10 15

Arg Ala Glu Ile Leu Pro Asp Thr Thr Tyr Leu Gly Pro Leu Asn Cys
20 25 30

Lys Ser Cys Trp Gln Arg Phe Asp Ser Leu Val Arg Cys His Asp His
35 40 45

Tyr Leu Cys Arg His Cys Leu Asn Leu Leu Leu Ser Val Ser Asp Arg
50 55 60

Cys Pro Leu Cys Lys His Pro Leu Pro Thr Lys Leu Lys Ile Ser Thr
65 70 75 80

Ala Pro Ser Ser Pro Pro Pro Tyr Glu Glu
85 90

<210> 10

<211> 4604

5 <212> ADN

<213> Virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV)

<220>

<223> Segmento S del Clon 13 de LCMV que codifica gB de la cepa de HCMV Merlin (tipo salvaje de longitud completa)

10 <400> 10

gcgcaccggg gatcctaggc tttttggatt gcgctttcct ctagatcaac tgggtgtcag	60
gccctatcct acagaaggat ggaatccagg atctggtgcc tggtagtctg cgtaacttg	120
tgtatcgtct gtctgggtgc tggggtttcc tcatcttcta ctcggtggaac ttctgctact	180
cacagtcacc attcctctca tacgacgtct gctgctcact ctcgatccgg ttcagtctct	240
caacgcgtaa cttcttccca aacggtcagc catggtgtta acgagacat ctacaacact	300
accctcaagt acggagatgt ggtgggggtc aataccacca agtacccta tgcggtgtgt	360
tctatggccc aggttacgga tcttattcgc tttgaacgta atatcgtctg cacctcgatg	420
aagcccatca atgaagacct ggacgagggc atcatggtgg tctacaaacg caacatcgtc	480
gcgcacacct ttaaggtagc agtctaccag aaggttttga cgtttcgtcg tagctacgct	540
tacatccaca ccacttatct gctgggcagc aacacggaat acgtggcgcc tctatgtgg	600
gagattcatc atatcaacag ccacagtcag tgctacagtt cctacagccg cgttatagca	660

ES 2 811 093 T3

ggcacggttt tcgtggctta tcatagggac agctatgaaa acaaaacat gcaattaatg 720
 cccgacgatt attccaacac ccacagtacc cgttacgtga cggccaagga tcaatggcac 780
 agccgcggca gcacctggct ctatcgtgag acctgtaatc tgaattgtat ggtgaccatc 840
 actactgcgc gctccaaata tccttatcat tttttcgcca cttccacggg tgacgtggtt 900
 gacatttctc ctttctacaa cggaaccaat cgcaatgcca gctactttgg agaaaacgcc 960
 gacaagtttt tcatttttcc gaactacact attgtctccg actttggaag accgaattct 1020
 gcgtagaga cccacaggtt ggtggctttt cttgaacgtg cggactcggg gatctcctgg 1080
 gatatacagg acgaaaagaa tgtcacttgt caactcactt tctgggaagc ctoggaacgc 1140
 accattcgtt ccgaagccga ggactcgtat cacttttctt ctgccaaaat gaccgccact 1200
 ttcttatcta agaagcaaga ggtgaacatg tccgactctg cgctggactg cgtacgtgat 1260
 gaggctataa ataagttaca gcagattttc aatacttcat acaatcaaac atatgaaaaa 1320
 tatggaaacg tgtccgtctt tgaaaccact ggtggtttgg tagtgttctg gcaaggtatc 1380
 aagcaaaaat ctctggtgga actcgaacgt ttggccaacc gctccagtct gaatcttact 1440
 cataatagaa ccaaaagaag tacagatggc aacaatgcaa ctcatttatc caacatggaa 1500
 tcggtgcaca atctggtcta cgcccagctg cagttcacct atgacacggt gcgcggttac 1560
 atcaaccggg cgctggcgca aatcgcagaa gcctggtgtg tggatcaacg gcgcacccta 1620
 gaggtcttca aggaactcag caagatcaac ccgctagcca ttctctcggc catttacaac 1680
 aaaccgattg ccgocggtt catgggtgat gtcttgggcc tggccagctg cgtgaccatc 1740
 aaccaaaacca gcgtcaaggt gctgcgtgat atgaacgtga aggagtcgcc aggacgctgc 1800
 tactcacgac ccgtggtcat ctttaatttc gccaacagct cgtacgtgca gtacggtcaa 1860
 ctgggcgagg acaacgaaat cctgttgggc aaccaccgca ctgaggaatg tcagcttccc 1920
 agcctcaaga tcttcatcgc cgggaactcg gcctacgagt acgtggacta cctcttcaaa 1980
 cgcatgattg acctcagcag tatctccacc gtogacagca tgatcgccct ggatatcgac 2040
 ccgctggaaa ataccgactt caggttactg gaactttact cgcagaaaga gctgcgttcc 2100
 agcaacgttt ttgacctcga agagatcatg cgogaattca actcgtacaa gcagcgggta 2160
 aagtacgtgg aggacaaggt agtcgaccg ctaccgccct acctcaaggg tctggacgac 2220
 ctcatgagcg gcctgggccc cgcgggaaag gccgttggcg tagccattgg gccggtgggt 2280
 ggcgcggtgg cctccgtggt cgaaggcgtt gccaccttcc tcaaaaaccc cttcggagcg 2340
 ttaccatca tcctcgtggc catagctgta gtcattatca cttatttgat ctatactcga 2400
 cagcggcgtt tgtgcacgca gccgctgag aacctcttc cctatctggt gtccgacgac 2460
 gggaccaccg tgacgtcggg cagcaccaaa gacacgtcgt tacaggctcc gccttcctac 2520

ES 2 811 093 T3

gaggaaagtg tttataattc tggctgcaaa ggaccgggac caccgtcgtc tgatgcatcc 2580
acggcggctc cgccttacac caacgagcag gcttaccaga tgcttctggc cctggcccgt 2640
ctggacgcag agcagcagc gcagcagaac ggtacagatt ctttgacgg acggactggc 2700
acgcaggaca agggacagaa gcccaacctc ctagaccgac tgcgacatcg caaaaacggc 2760
taccgacact tgaaagactc tgacgaagaa gagaacgtct gaagaacagc gcctccctga 2820
ctctccacct cgaaagaggt ggagagtcag ggaggcccag agggctctag agtgtcacia 2880
catttgggccc tctaaaaatt aggtcatgtg gcagaatggt gtgaacagtt ttcagatctg 2940
ggagccttgc tttggaggcg ctttcaaaaa tgatgcagtc catgagtgca cagtgcgggg 3000
tgatctcttt cttctttttg tcccttacta ttccagatg catcttacac aaccagccat 3060
atttgtccca cactttatct tcatactccc tcgaagcttc cctggctatt tcaacatcga 3120
taagcttaat gtccttccca ttttgtgagt ccagaagctt tctgatgtca tcggagcctt 3180
gacagcttag aaccatcccc tgcggaagag cacctataac tgacgaggtc aaccggggtt 3240
gcgcatgaa gaggtcggca agatccatgc cgtgtgagta cttggaatct tgcttgaatt 3300
gtttttgatc aacgggttcc ctgtaaaagt gtatgaactg cccgttctgt ggttgaaaa 3360
ttgctatctt cactggatca ttaaactac cctcaatgc aatccatgta ggagcgttgg 3420
gggtcaattcc tcccatgagg tcttttaaaa gcattgtctg gctgtagctt aagcccacct 3480
gaggtggacc tgctgtccca ggcgtggccc tgggtgagtt gactgcaggt ttctcgttg 3540
tgagatcaat tgttgtggtt tcccatgctc tccccacaat cgatgttcta caagctatgt 3600
atggccatcc ttcacctgaa aggcaaaact tatagaggat gttttcataa gggttcctgt 3660
ccccaaactg gtctgaaaca aacatgttga gttttctctt ggccccgaga actgccttca 3720
agagatcctc gctgttgctt ggcttgatca aaattgactc taacatgta cccccatcca 3780
acagggctgc ccctgccttc acggcagcac caagactaaa gttatagcca gaaatgttga 3840
tgctggactg ctgttcagtg atgaccccc gaactgggtg cttgtctttc agcctttcaa 3900
gatcattaag atttggatac ttgactgtgt aaagcaagcc aaggctctgt agcgcttgta 3960
caacgtcatt gagcggagtc tgtgactggt tggccataca agccatagtt agacttgca 4020
ttgtgccaaa ttgattgttc aaaagtgatg agtctttcac atcccaaact cttaccacac 4080
cacttgacc ctgctgaggc tttctcatcc caactatctg taggatctga gatctttgg 4140
ctagttgctg tgttgttaag ttccccatat ataccctga agcctggggc ctttcagacc 4200
tcatgatctt ggccttcagc ttctcaaggt cagccgcaag agacatcagt tcttctgcac 4260
tgagcctccc cactttcaaa acattcttct ttgatgttga ctttaaatcc acaagagaat 4320
gtacagtctg gttgagactt ctgagctctt gtaggctctt gtcactctctc ttttccttcc 4380
tcatgatcct ctgaacattg ctgacctcag agaagtccaa cccattcaga aggttggttg 4440
catccttaat gacagcagcc ttcacatctg atgtgaagct ctgcaattct cttctcaatg 4500
cttgctcca ttggaagctc ttaacttctc tagacaagga catcttggtg ctcaatggtt 4560
tctcaagaca aatgcgcaat caaatgccta ggatccactg tgcg 4604

<210> 11
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5

	<220>		
	<223> Cebador específico de WE		
	<400> 11		
5	aatcgtctct aaggatgggt cagattgtga caatg		35
	<210> 12		
	<211> 35		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
10	<220>		
	<223> Cebador de fusión específico de WE que porta un saliente complementario al cebador específico de WET		
	<400> 12		
	aatcgtctct aaggatgggt cagattgtga caatg		35
15	<210> 13		
	<211> 37		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
20	<223> Cebador específico de WET		
	<400> 13		
	ctcgggtgatc atgttatctg cttcttggtc gatttga		37
25	<210> 14		
	<211> 34		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador de fusión específico de WET complementario a la secuencia de WE		
30	<400> 14		
	aatcgtctct ttctttatct cctcttccag atgg		34
35	<210> 15		
	<211> 23		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador específico de NP de LCMV		
40	<400> 15		
	ggctcccaga tctgaaaact gtt		23
45	<210> 16		
	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador específico de NP y GP		
	<400> 16		
50	gctggcttgt cactaatggc tc		22

ES 2 811 093 T3

<210> 17
 <211> 535
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Secuencia representativa de ADNc obtenida del animal no. 3 (r3LCMV-GFPnat no. 3) que revela un segmento S recombinado que combina secuencias de NP y GP

<400> 17
 aagaagcaga taacatgatc accgagatgc tgaggaagga ctacatcaag agacagggca 60
 gcacccccct ggcctcatg gatctgctca tgttcagcac cagcgcctac ctcatcagca 120
 tcttcctgca cctggtgaag atccccaccc acagacacat caagggcggc agctgccccca 180
 agccccacag actcaccaac aagggcatct gcagctgagg cgcttcaag gtgcccggcg 240
 taaaaacat ctggaagagg agataaagaa cagcgcctcc ctgactctcc acctcgaaaag 300
 aggtggagag tcagggaggc ccagagggtc ttactgttac agctcgtcca tgccgagagt 360
 gatcccggcg gcggtcacga actccagcag gaagaacagc gcctccctga ctctccacct 420
 cgaaagaggt ggagagtcag ggaggcccag aggtcttaga gtgtcacaac atttgggcct 480
 ctaaaaatta ggtcatgtgg cagaatgttg tgaacagttt tcagatctgg gagcc 535

10 <210> 18
 <211> 2555
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Segmento S 1 de r3LCMV-P1A (que contiene NP)

<400> 18
 gcgcaccggg gatcctaggc tttttggatt gcgcttctct ctagatcaac tgggtgtcag 60
 gccctatcct acagaaggat gagcgacaac aagaagcccg acaaggccca ctctggcagc 120
 ggcggagatg gcgacggcaa cagatgtaac ctgctgcaca gatacagcct ggaagagatc 180

ES 2 811 093 T3

ctgccctacc tgggctggct ggtgttcgcc gtcgtgacaa caagcttcct ggccctgcag 240
atgttcatcg acgccctgta cgaggaacag tacgagaggg acgtggcctg gatcgccaga 300
cagagcaaga gaatgagcag cgtggacgag gacgagatg atgaggacga cgaagatgac 360
tactacgacg atgaggatga cgacgacgac gccttctacg atgacgagga cgatgaagag 420
gaagaactgg aaaacctgat ggacgacgag tccgagatg aggccgagga agagatgagc 480
gtgaaatgg gcgctggcgc cgaagagatg ggagccggcg ctaactgtgc ttgctgcca 540
ggacaccacc tgagaagaa cgaagtgaag tgccggatga tctacttctt ccacgacccc 600
aactttctgg tgtccatccc cgtgaacccc aaagaacaga tggaatgcag atgcgagaac 660
gccgacgaag aggtggccat ggaagaagaa gaggaagagg aagaagaaga agaagaggaa 720
gaaatgggca accccgacgg cttcagcccc tgaagaacag cgcctccctg actctccacc 780
tcgaaagagg tggagagtca gggagggcca gagggcttta gagtgtcaca acatttgggc 840
ctctaaaaat taggtcatgt ggcagaatgt tgtgaacagt tttcagatct gggagccttg 900
ctttggaggc gctttcaaaa atgatgcagt ccatgagtgc acagtgcggg gtgatctctt 960
tcttcttttt gtcccttact attccagtat gcatcttaca caaccagcca tatttgtccc 1020
acactttatc ttcatactcc ctcgaagctt ccctggtcat ttcaacatcg ataagcttaa 1080
tgtccttcct attttgtgag tccagaagct ttctgatgtc atcggagcct tgacagctta 1140
gaaccatccc ctgcggaaga gcacctataa ctgacgaggt caaccgggtg tgcgattga 1200
agaggtcggc aagatccatg ccgtgtgagt acttggaaac ttgcttgaat tgttttgat 1260
caacgggttc cctgtaaaag tgtatgaact gcccgctctg tggttgaaa attgctattt 1320
ccactggatc attaaaacta ccctcaatgt caatccatgt aggagcgttg gggccaatc 1380
ctcccatgag gtctttttaa agcattgtct ggctgtagct taagcccacc tgaggtggac 1440
ctgctgctcc aggcgctggc ctgggtgagt tgactgcagg tttctcgctt gtgagatcaa 1500
ttgttgtgtt ttcccatgct ctccccacaa tcgatgttct acaagctatg tatggccatc 1560
cttcacctga aaggcaaaact ttatagagga tgttttcata agggttcctg tccccactt 1620
ggtctgaaac aaacatgttg agttttctct tggccccgag aactgccttc aagagatcct 1680
cgctgttgct tggcttgatc aaaattgact ctaacatgtt acccccatcc aacaggcctg 1740
cccctgcctt cacggcagca ccaagactaa agttatagcc agaaatgttg atgctggact 1800
gctgttcagt gatgaccccc agaactgggt gcttgtcttt cagcctttca agatcattaa 1860
gatttggata cttgactgtg taaagcaagc caaggctctgt gagcgcttgt acaacgtcat 1920
tgagcggagt ctgtgactgt ttggccatac aagccatagt tagacttggc attgtgcaa 1980
attgattgtt caaaagtgat gagtctttca catcccaaac tcttaccaca ccacttgcac 2040
cctgctgagg ctttctcatc ccaactatct gtaggatctg agatctttgg tctagttgct 2100

ES 2 811 093 T3

gtggtttaa gttccccata tatacccctg aagcctggg cctttcagac ctcatgatct 2160
 tggccttcag cttctcaagg tcagccgcaa gagacatcag ttcttctgca ctgagcctcc 2220
 ccactttcaa aacattcttc tttgatgttg actttaaatc cacaagagaa tgtacagtct 2280
 ggttgagact tctgagtctc tgtaggtcct tgtcatctct cttttccttc ctcatgatcc 2340
 tctgaacatt gctgacctca gagaagtcca acccattcag aaggttggtt gcatccttaa 2400
 tgacagcagc cttcacatct gatgtgaagc tctgcaattc tcttctcaat gcttgctcc 2460
 attggaagct cttaaacttc ttagacaagg acatcttggt gctcaatggt ttctcaagac 2520
 aatgcgcaa tcaaatgcct aggatccact gtgcg 2555

<210> 19
 <211> 2375
 <212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Segmento S 2 de r3LCMV-P1A (que contiene GP)

<400> 19
 gcgcacccggg gatcctaggc tttttggatt gcgctttcct ctagatcaac tgggtgtcag 60
 gccctatcct acagaaggat gagcgacaac aagaagcccg acaaggcca ctctggcagc 120
 ggcggagatg gcgacggcaa cagatgtaac ctgctgcaca gatacagcct ggaagagatc 180
 ctgccctacc tgggctggct ggtgttcgcc gtcgtgacaa caagcttcct ggccctgacg 240
 atgttcatcg acgccctgta cgaggaacag tacgagaggg acgtggcctg gatcgccaga 300
 cagagcaaga gaatgagcag cgtggacgag gacgaggatg atgaggacga cgaagatgac 360
 tactacgacg atgaggatga cgacgacgac gccttctacg atgacgagga cgatgaagag 420
 gaagaactgg aaaacctgat ggacgacgag tccgaggatg aggccgagga agagatgagc 480
 gtggaatgg gcgctggcgc cgaagagatg ggagccggcg ctaactgtgc ttgctgcca 540
 ggacaccacc tgagaaagaa cgaagtgaag tgccggatga tctacttctt ccacgacccc 600
 aactttctgg tgtccatccc cgtgaacccc aaagaacaga tggaatgcag atgcgagaac 660
 gccgacgaag aggtggccat ggaagaagaa gaggaagagg aagaagaaga agaagaggaa 720
 gaaatgggca accccgacgg cttcagcccc tgaagaacag cgctccctg actctccacc 780
 tcgaaagagg tggagagtca gggaggccca gaggtctca gcgtctttc cagacggttt 840
 ttacaccagg caccttaaat gcaccacaac taaaaattcc tttgttggtt aatcggtgtg 900
 gctttggaca tgagccacct tttatgtgcc tgtgtgttgg tattttgaca aggtgcagga 960
 agatgctgac tagatatgca gatgtgaaa acatcagaag gtccatcaat gctagggggg 1020
 tactcccctg cctctttatg taatccttc tcaacatctc tgtaatcatg ttatcggtt 1080

ES 2 811 093 T3

cctgttcgat ttggtcactg aagtgggtct catttaagta agaaccattg gtgacaagcc 1140
 agcacttggg gacactagtt tcgccggtct ttgcatgttc taggtaccaa aactttgagt 1200
 aattgcaata tggcaccccc atcagatctc tcaagtggtt cctcatcagt agttgatctg 1260
 aatcaaaga attcactggt gttttgaata agtgcaaggc agattctacg tctctttga 1320
 acttactcaa agcagccttg ttgtagtcaa ttagtcgcag catgtcacag aattcttcat 1380
 catgatttac attgcatttc gcaactgctg tgttcccga aacttaagc tctgcagcaa 1440
 gaatcatcca tttggtcagg caataaccac ctggattctc caccctgaa gagtctgaca 1500
 aagtccaggt gaatgtgccc gctagtctcc tagtggagaa cttagttttc tcttgggaaa 1560
 ggagaatcct ggacatccca aaaggacctg catatgtgca gtggttttcc caggttctat 1620
 tttgtataat caggtattgg taactcgtct ggctacacca ggtggtcttg ccatctgagc 1680
 ctgtccagcc ccagccactc ctcatgtatt tcccccgaa ggagttcta aacatatcta 1740
 ggactctacc tctgaagggt ctacactggc tctgagcact ttgtgcatct gagaatgtca 1800
 agttgtattg gatggttatg ccattgttga agtcgcagga tactgcctta tagttggagt 1860
 tccctctgat actgaggtgt aggctcgaaa ctatactcat gagtgtgtgg tcaaaggtct 1920
 tttgttgaa ggagaggtc agattgcaaa agttgtgact gatgatggaa tcattggtga 1980
 aggtcaattc tagtcagaa gtccccatac tgatgtaatg gtgggagttg ttggctgaa 2040
 atgctgtggg catggtcagg ttcagatgtg acatatcaaa ctccactgac ttaaattggt 2100
 aaactccttt gtaaatgtcg ggtcccttaa gaccgtacat gccacaggac ctgccagcca 2160
 gaagtaggaa actgatcaat gcgaatatcc cacaggtggc aaaattgtag acagccttga 2220
 taccctgat cacgataagc acaataatga caatgttcat cacctcatcg atgatgtgag 2280
 gcagagcctc aaacattgtc acaatctgac ccatcttgtt gctcaatggt ttctcaagac 2340
 aatgcgcaa tcaaatgcct aggatccact gtgcg 2375

<210> 20
 <211> 7229
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Segmento L de r3LCMV-P1A

<400> 20
 gcgcaccggg gatcctaggc gtttagttgc gctgtttggg tgcacaactt tcttcgtgag 60
 gctgtcagaa gtggacctgg ctgatagcga tgggtcaagg caagtccaga gaggagaaag 120
 gcaccaatag tacaacagc gccgaaatcc taccagatac cacctatctt ggccctttaa 180
 gctgcaaatc ttgctggcag aaatttgaca gcttggtgtaag atgccatgac cactaccttt 240
 gcaggcactg tttaaaccct ctgctgtcag tatccgacag gtgtcctctt tgtaaatatc 300

ES 2 811 093 T3

cattaccaac cagattgaag atatcaacag cccaagctc tccacctccc tacgaagagt 360
 aacaccgtcc ggccccggcc cgcacaaaaca gcccagcaca agggaaccgc acgtcaccca 420
 acgcacacag acacagcacc caacacagaa cacgcacaca cacacacaca cacaccacaca 480
 cgcacgcgcc cccaccaccg gggggcgccc cccccgggg ggcggccccc cgggagcccg 540
 ggcggagccc cacggagatg cccatcagtc gatgtcctcg gccaccgacc cgcccagcca 600
 atcgtcgcag gacctcccct tgagtctaaa cctgcccccc actgtttcat acatcaaagt 660
 gctcctagat ttgctaaaac aaagtctgca atccttaaag gcgaaccagt ctggcaaaag 720
 cgacagtgga atcagcagaa tagatctgtc tatacatagt tcctggagga ttacacttat 780
 ctctgaacct aacaaatggt caccagttct gaatcgatgc aggaagaggt tccaaggac 840
 atcactaatc ttttcatagc cctcaagtcc tgctagaaag actttcatgt ccttggcttc 900
 cagcttcaca atgatatttt ggacaagggt tcttccttca aaaagggcac ccatctttac 960
 agtcagtggc acaggctccc actcaggtcc aactctctca aagtcaatag atctaataccc 1020
 atccagtatt cttttggagc ccaacaactc aagctcaaga gaatcaccaa gtatcaaggg 1080
 atcttccatg taatcctcaa actcttcaga tctgatatca aagacacat cgttcacctt 1140
 gaagacagag tctgtcctca gtaagtggag gcattcatcc aacattcttc tatctatctc 1200
 acccttaaag aggtgagagc atgataaaag ttcagccaca cctggattct gtaattggca 1260
 cctaaccaag aatatcaatg aaaatttctc taaacagtca gtattattct gattgtgcgt 1320
 aaagtccact gaaattgaaa actccaatac cccttttggt tagttgagca tgtagtccca 1380
 cagatccttt aaggatttaa atgcctttgg gtttgtcagg ccctgcctaa tcaacatggc 1440
 agcattacac acaacatctc ccattcggta agagaaccac ccaaaaacca actgcaaatac 1500
 attcctaaac ataggcctct ccacattttt gttcaccacc tttgagaaa atgattgaaa 1560
 ggggccaggt gcctcagcac catcttcaga tggcatcatt tctttatgag ggaacctga 1620
 aaaattgcct aatgtcctgg ttgttgcaac aaattctcga acaaatgatt caaaatacac 1680
 ctgttttaag aagttcttgc agacatocct cgtgctaaca acaaatcat caaccagact 1740
 ggagtcagat cgctgatgag aattggcaag gtcagaaaac agaacagtgt aatgttcac 1800
 ccttttccac ttaacaacat gagaaatgag tgacaaggat tctgagtaa tatcaattaa 1860
 aacacagagg tcaaggaatt taattctggg actccacctc atgtttttg agtcatgtc 1920
 agacataaat ggaagaagct gatcctcaaa gatcttggga tatagccgc tcacagattg 1980
 aatcacttgg ttcaaattca ctttgcctc cagtagcctt gagctctcag gctttcttgc 2040
 tacataatca catgggttta agtgcttaag agttaggttc tactgttat tcttcccttt 2100
 ggtcggttct gctaggacct aaacacccaa ctcaaaagag ttgctcaatg aaatacaaat 2160

ES 2 811 093 T3

gtagtcccaa agaagaggcc ttaaaaggca tatatgatca cggtagggctt ctggatgaga 2220
 ctgtttgtca caaatgtaca gcgttatacc atccccgattg caaactcttg tcacatgatc 2280
 atctgtgggt agatcctcaa gcagcttttt gatatacaga ttttccctat ttttgttct 2340
 cacacacctg cttcctagag ttttgcaaag gcctataaag ccagatgaga tacaactctg 2400
 gaaagctgac ttgttgattg cttctgacag cagcttctgt gcaccccttg tgaatttact 2460
 acaaagtttg ttctggagtg tcttgatcaa tgatgggatt ctttctctt ggaaagtcat 2520
 cactgatgga taaaccacct tttgtcttaa aaccatcctt aatgggaaca tttcattcaa 2580
 attcaaccag ttaacatctg ctaactgatt cagatcttct tcaagaccga ggaggtctcc 2640
 caattgaaga atggcctcct ttttatctct gttaaatagg tctaagaaaa attcttcatt 2700
 aaattcacca tttttgagct tatgatgcag tttccttaca agctttctta caacctttgt 2760
 ttcattagga cacagttcct caatgagtct ttgtattctg taacctctag aaccatccag 2820
 ccaatctttc acatcagtgt tggatttcag tagaaatgga tccaaaggga aattggcata 2880
 ctttaggag tccagtgttc tcctttggat actattaact agggagactg ggacgccatt 2940
 tgcgatggct tgatctgcaa ttgtatctat tgtttcacaa agttgatgtg gctctttaca 3000
 cttgacattg tgtagcgtg cagatacaaa ctttgtgaga agagggactt cctccccca 3060
 tacatagaat ctagatttaa attctgcagc gaacctcca gccacacttt ttgggctgat 3120
 aaatttgttt aacaagccgc tcagatgaga ttggaattcc aacaggacia ggacttcctc 3180
 cggatcactt acaaccaggt cactcagcct cctatcaaat aaagtgatct gatcatcact 3240
 tgatgtgtaa gcctctggtc tttcgccaaa gataacacca atgcagtagt tgatgaacct 3300
 ctcgctaagc aaacctataga agtcagaagc attatgcaag attccctgcc ccatatcaat 3360
 aaggctggat atatgggatg gcactatccc catttcaaaa tattgtctga aaattctctc 3420
 agtaacagtt gtttctgaac ccctgagaag ttttagcttc gacttgacat atgatttcat 3480
 cattgcattc acaacaggaa aggggacctc gacaagctta tgcatgtgcc aagttaacaa 3540
 agtgctaaca tgatctttcc cggaacgcac atactggtca tcacctagtt tgagattttg 3600
 tagaaacatt aagaacaaaa atgggcacat cattgtctcc catttgctgt gatccatact 3660
 atagttaaag aacccttccc gcacattgat agtcattgac aagattgcat tttcaaattc 3720
 cttatcattg tttaaacagg agcctgaaaa gaaacttgaa aaagactcaa aataatcttc 3780
 tattaacctt gtgaacattt ttgtctcaa atctccaata tagagttctc tatttcccc 3840
 aacctgctct ttataagata gtgcaaattt cagcctcca gagtcaggac ctactgaggt 3900
 gtatgatggt ggtgattctt ctgagtagaa gcacagattt ttcaaagcag cactcataca 3960
 ttgtgtcaac gacagagctt tactaaggga ctcagaatta ctttccctct cactgattct 4020
 cacgtcttct tccagtttgt cccagtcaaa tttgaaattc aagccttgcc tttgcatatg 4080

ES 2 811 093 T3

cctgtatttc cctgagtacg catttgcaac agaatcatct tcatgcaaga 4140
aaaccaatca ttctcagaaa agaactttct acaaaggttt tttgccatct catcgaggcc 4200
aactgatct ttaatgactg aggtgaaata caaaggtagc agctctgtgg aaccctcaac 4260
agcctcacag ataaatttca tgtcatcatt ggtagacat gatgggtcaa agtcttctac 4320
taaatgaaa gatatttctg acaagataac ttttcttaag tgagccatct tccctgtag 4380
aataagctgt aatgatgta gtccttttgt atttgtaagt ttttctccat ctctttgtc 4440
attggcctc ctacctctc tgtaccgtgc tattgtggtg ttgacctttt ctctgagact 4500
tttgaagaag cttgtctctt cttctccatc aaaacatatt tctgccaggt tgtcttccga 4560
tctccctgtc tcttctccct tggaaaccgat gaccaatcta gagactaact tggaaacttt 4620
atattcatag tctgagtggc tcaacttata cttttgtttt cttacgaaac tctccgtaat 4680
ttgactcaca gactaacia gcaatttggt aaagtcatat tccagaagtc gttctccatt 4740
tagatgctta ttaaccacca cacttttggt actagcaaga tctaagtctg tcgcacatcc 4800
agagttagtc atgggatcta ggctgtttag cttcttctct cctttgaaaa ttaaagtgcc 4860
gttgtaaat gaagacacca ttaggctaaa ggcttccaga ttaacacctg gagttgtatg 4920
ctgacagtca atttctttac tagtgaatct cttcatttgc tcatagaaca cacattctc 4980
ctcaggagtg attgcttctt tggggtgac aaaaaacca aattgacttt tgggctcaa 5040
gaacttttca aaacatttta tctgatctgt tagcctgtca ggggtctcct ttgtgatcaa 5100
atgacacagg tatgacacat tcaacataaa tttaaatttt gactcaaca acaccttctc 5160
accagtacca aaaatagttt ttattaggaa tctaagcagc ttatacacca ccttctcagc 5220
aggtgtgatc agatcctccc tcaacttata cattaatgat gtagatgaaa aatctgacac 5280
tattgccatc accaaatata tgacactctg tacctgcttt tgatttctct ttgttggtt 5340
ggtgagcatt agcaacaata gggctctcag tgcaacctca atgtcgggta gacagtcttt 5400
caaatcagga catgatctaa tccatgaaat catgatgtct atcatattgt ataagacctc 5460
atctgaaaaa attggtaaaa agaacctttt aggatctgca tagaaggaaa ttaatgacc 5520
atccgggctc tgtatggagt agcaccttga agattctcca gtcttctggt ataatagggtg 5580
gtattcttca gagtccagtt ttattacttg gcaaacact tctttgcatt ctaccacttg 5640
atatctcaca gacctattt gatthtgcct tagtctagca actgagctag ttttcatact 5700
gtttgttaag gccagacaaa cagatgataa tcttctcagg ctctgtatgt tcttcagctg 5760
ctctgtgctg ggttggaat tgtaatctc aaacttcgta taatacatta tcgggtgagc 5820
tccaattttc ataaagtctc caaattcagt gaatggtatg tggcattctt gctcaagggtg 5880
ttcagacagt ccgtaatgct cgaaactcag tcccaccact aacaggcatt tttgaatttt 5940

ES 2 811 093 T3

tgcaatgaac tcactaatag atgccctaaa caattcctca aaagacacct ttctaaacac 6000
 ctttgacttt tttctattcc tcaaaagtct aatgaactcc tctttagtgc tgtgaaagct 6060
 taccagccta tcattcacac tactatagca acaaccacc cagtgtttat cattttttaa 6120
 ccctttgaat ttcgactggt ttatcaatga ggaaagacac aaaacatcca gatttaacaa 6180
 ctgtctcctt ctagtattca acagtttcaa actcttgact ttgtttaaca tagagaggag 6240
 cctctcatat tcagtgctag tctcacttcc cctttcgtgc ccatgggtct ctgcagttat 6300
 gaatctcatc aaaggacagg attcgactgc ctccctgctt aatgttaaga tatcatcact 6360
 atcagcaagg ttttcataga gctcagagaa ttccttgatc aagccttcag ggtttacttt 6420
 ctgaaagttt ctctttaatt tcccacttcc taaatctctt ctaaacctgc tgaaaagaga 6480
 gtttattcca aaaaccacat catcacagct catggtgggg ttgatgcctt cgtggcacat 6540
 cctcataatt tcatcattgt gagttgacct cgcactcttc agaattttca tagagtccat 6600
 accggagcgc ttgtcgatag tagtcttcag ggactcacag agtctaaaat attcagactc 6660
 ttcaaagact ttctcatttt ggttagaata ctccaaaagt ttgaataaaa ggtctctaaa 6720
 tttgaagttt gccactctg gcataaaact attatcataa tcacaacgac catctactat 6780
 tggaactaat gtgacaccgg caacagcaag gtcttccctg atgcatgcca atttgttagt 6840
 gtcctctata aatttcttct caaaactggc tggagtgtc ctaacaaaac actcaagaag 6900
 aatgagagaa ttgtctatca gcttgtaacc atcaggaatg ataagtggta gtcctgggca 6960
 tacaattcca gactccacca aaattgttcc cacagactta tcgtcgtggt tgtgtgtgca 7020
 gccactcttg tctgcactgt ctatttcaat gcagcgtgac agcaacttga gtcctcaat 7080
 cagaaccatt ctgggttccc tttgtcccag aaagttgagt ttctgccttg acaacctctc 7140
 atcctgttct atatagttta aacataactc tctcaattct gagatgattt catccattgc 7200
 gcatcaaaaa gcctaggatc ctoggtgcg 7229

<210> 21

<211> 2628

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Segmento S 1 de r3JUNV-P1A (que contiene NP)

<400> 21

gcgcaccggg gatcctaggc gattttggtt acgctataat tgtaactggt ttctgtttgg 60
 acaacatcaa aaacatccat tgcaaatga gcgacaacaa gaagcccggc aaggcccact 120
 ctggcagcgg cggagatggc gacggcaaca gatgtaacct gctgcacaga tacagcctgg 180
 aagagatcct gccctacctg ggctggctgg tgttcgcoct cgtgacaaca agcttcctgg 240
 ccctgcagat gttcatcgac gccctgtacg aggaacagta cgagagggac gtggcctgga 300

10

ES 2 811 093 T3

tcgccagaca gagcaagaga atgagcagcg tggacgagga cgaggatgat gaggacgacg 360
 aagatgacta ctacgacgat gaggatgacg acgacgacgc cttctacgat gacgaggacg 420
 atgaagagga agaactggaa aacctgatgg acgacgagtc cgaggatgag gccgaggaag 480
 agatgagcgt ggaaatgggc gctggcgcg aagagatggg agccggcgct aactgtgctt 540
 gcgtgccagg acaccacctg agaaagaacg aagtgaagtg ccgatgatc tacttcttcc 600
 acgaccccaa ctttctggtg tccatccccg tgaaccccaa agaacagatg gaatgcagat 660
 gcgagaacgc cgacgaagag gtggccatgg aagaagaaga ggaagaggaa gaagaagaag 720
 aagaggaaga aatgggcaac cccgacggct tcagcccctg agacctcctg agggccccca 780
 ccagcccggg cactgcccgg gctggtgtgg cccccagtc cgcggcctgg ccgcgactg 840
 gggaggcact gcttacagtg cataggctgc cttcgggagg aacagcaagc tcggtggtaa 900
 tagaggtgta gttcctcct catagagctt cccatctagc actgactgaa acattatgca 960
 gtctagcaga gcacagtgtg gttcactgga ggccaacttg aagggagtat cttttccct 1020
 cttttctta ttgacaacca ctccattgtg atatttgcat aagtgacct atttctcca 1080
 gacctgttga tcaaactgcc tggcttgttc agatgtgagc ttaacatcaa ccagtttaag 1140
 atctcttctt ccatggaggt caaacaactt cctgatgtca tcgcatcctt gagtagtcac 1200
 aacctgtct ggaggcagca agccgatcac gtaactaaga actcctggca ttgcatcttc 1260
 tatgtccttc attaagatgc cgtgagagtg tctgctacca ttttaaac ctttctcatc 1320
 atgtggtttt ctgaagcagt gaatgtactg cttacctgca ggttgaata atgccatctc 1380
 aacagggta ctggctgtgc cttcaatgtc gagccaaagg gtgttgggtg ggtcgagttt 1440
 cccactgcc tctctgatga cagcttcttg tatctctgtc aagttagcca atctcaaatt 1500
 ctgaccgttt tttccggct gtctaggacc agcaactggt ttcctgtca gatcaatact 1560
 tgtgtgtcc catgacctgc ctgtgatattg tgatctagaa ccaatataag gccaaccatc 1620
 gccagaaaga caaagtttgt acaaaaaggtt ttcataagga tttctattgc ctggtttctc 1680
 atcaataaac atgccttctc ttcgtttaac ctgaatggtt gattttatga gggaagagaa 1740
 gttttctggg gtgactctga ttgtttocaa catgtttcca ccatcaagaa tagatgctcc 1800
 agcctttact gcagctgaaa gactgaagtt gtaaccagaa atattgatgg agctttcatc 1860
 tttagtcaca atctgaagc agtcatgttc ctgagtcagt ctgtcaaggt cacttaagtt 1920
 tggatacttc acagtgtata gaagcccaag tgaggttaaa gcttgtatga cactgttcat 1980
 tgtctcacct ccttgaacag tcatgcatgc aattgtcaat gcaggaacag agccaaactg 2040
 attgtttagc tttgaagggt ctttaacatc ccatatctc accacacat tccccagt 2100
 cccttgctgt tgaatccca gtgttctcaa tatctctgat cttttagcaa gttgtgactg 2160

ES 2 811 093 T3

ggacaagtta cccatgtaaa ccccctgaga gcctgtctct gctcttctta tcttgTTTT 2220
 taatttctca aggtcagacg ccaactccat cagttcatcc ctcccagat ctcccacctt 2280
 gaaaactgtg tttcgttgaa cactcctcat ggacatgagt ctgtcaacct ctttattcag 2340
 gtccctcaac ttgttgagat cttcttcccc ctttttagtc tttctgagtg cccgctgac 2400
 ctgtgccact tggttgaagt cgatgctgtc agcaattagc ttggcgtcct tcaaaacatc 2460
 tgacttgaca gtctgagtga attggctcaa acctctcctt aaggactgag tccatctaaa 2520
 gcttggaaac tccttgagat gtgccatgcc agaagtctcg gtgattttga tctagaatag 2580
 agttgctcag taaaagtgtt agacactatg cctaggatcc actgtgcg 2628

<210> 22
 <211> 2391
 <212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Segmento S 2 de r3JUNV-P1A (que contiene GP)

<400> 22
 gcgcaccggg gatcctaggg gattttggtt acgctataat tgtaactggt ttctgTTTgg 60
 acaacatcaa aaacatccat tgcacaatga gcgacaacaa gaagcccggc aagggccact 120
 ctggcagcgg cggagatggc gacggcaaca gatgtaacct gctgcacaga tacagcctgg 180
 aagagatcct gccctacctg ggctggctgg tgttcgccgt cgtgacaaca agcttcctgg 240
 ccctgcagat gttcatcgac gccctgtacg aggaacagta cgagagggac gtggcctgga 300
 tcgccagaca gagcaagaga atgagcagcg tggacgagga cgaggatgat gaggacgacg 360
 aagatgacta ctacgacgat gaggatgacg acgacgacgc cttctacgat gacgaggacg 420
 atgaagagga agaactggaa aacctgatgg acgacgagtc cgaggatgag gccgaggaag 480
 agatgagcgt ggaatgggc gctggcggc aagagatggg agccggcgt aactgtgctt 540
 gcgtgccagg acaccacctg agaaagaacg aagtgaagtg ccggatgatc taattcttcc 600
 acgaccccaa ctttctgggtg tccatccccg tgaaccccaa agaacagatg gaatgcagat 660
 gcgagaacgc cgacgaagag gtggccatgg aagaagaaga ggaagaggaa gaagaagaag 720
 aagaggaaga aatgggcaac cccgacggct tcagcccctg agacctcctg agggTcccca 780
 ccagcccggg cactgcccg gctgggtgg cccccagtc cgcggcctgg ccgcgactg 840
 gggaggcact gcatggggca gttcattagc ttcattgcaag aaataccaac ctttttgacg 900
 gaggtctga acattgctct tgttgagtc agtctcattg ccatcattaa gggTatagtg 960
 aacttgTaca aaagtggTtt attccaattc tttgtattcc tagcgcttgc aggaagatcc 1020
 tgacagaag aagcttTcaa aatcgactg cactctgagt tccagactgt gtccttctca 1080
 atggtgggtc tcttttTcaa caatccacat gacctacctt tgttgtgtac cttaacaag 1140

ES 2 811 093 T3

agccatcttt acattaaggg gggcaatgct tcatttcaga tcagcttga tgatattgca 1200
gtattgttgc cacagtatga tgttataata caacatccag cagatatgag ctggtgttcc 1260
aaaagtgatg atcaaatttg gttgtctcag tggttcatga atgctgtggg acatgattgg 1320
catctagacc caccatttct gtgtaggaac cgtgcaaaga cagaaggctt catctttcaa 1380
gtcaacacct ccaagactgg tgtcaatgga aattatgcta agaagtttaa gactggcatg 1440
catcatttat atagagaata tcttgaccct tgcttgaatg gcaaactgtg cttaatgaag 1500
gcacaaccta ccagttggcc tctccaatgt ccaactcgacc acgttaacac attacacttc 1560
cttacaagag gtaaaaacat tcaacttcca aggaggtcct tgaaagcatt cttctcctgg 1620
tctttgacag actcatccgg caaggatacc cctggaggct attgtctaga agagtggatg 1680
ctcgtagcag ccaaaatgaa gtgttttggc aatactgctg tagcaaaatg caatttgaat 1740
catgactctg aattctgtga catgttgagg ctctttgatt acaacaaaaa tgctatcaaa 1800
accctaaatg atgaaactaa gaaacaagta aatctgatgg ggacagacaat caatgccctg 1860
atatctgaca atttattgat gaaaaacaaa attagggaac tgatgagtgt cccttactgc 1920
aattacacaa aattttggta tgtcaaccac acactttcag gacaacactc attaccaagg 1980
tgctggttaa taaaaacaaa cagctatttg aacatctctg acttccgtaa tgactggata 2040
ttagaaaagt acttcttaat ttctgaaatg ctaagcaaag agtattcgga caggcagggt 2100
aaaactcctt tgacttttagt tgacatctgt atttggagca cagtattctt cacagcgtca 2160
ctcttccttc acttgggtggg tataccctcc cacagacaca tcaggggcca agcatgccct 2220
ttgccacaca ggttgaacag cttgggtggt tgcagatgtg gtaagtacc caatctaaag 2280
aaaccaacag tttggcgtag aggacactaa gccagaagtt ctggtgattt tgatctagaa 2340
tagagttgct cagtgaaagt gttagacact atgcctagga tccactgtgc g 2391

<210> 23

<211> 7115

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Segmento L de r3JUNV-P1A

<400> 23

gcgaccggg gatcctaggc gtaacttcat cattaatac tcagattctg ctctgagtgt 60

gacttactgc gaagaggcag acaaatgggc aactgcaacg gggcatcaa gtctaaccag 120

ccagactcct caagagccac acagccagcc gcagaattta ggagggtagc tcacagcagt 180

ctatatggta gatataactg taagtgtctg tggtttctg ataccaattt gataacctgt 240

10 aatgatcact acctttgttt aagggtccat cagggtatgt taaggaattc agatctctgc 300

ES 2 811 093 T3

aatatctgct ggaagcccct gccaccaca atcacagtac cggaggagcc aacagcacca 360
ccaccatagc cagactgcac agggtcagac ccgaccccc ggggggcccc catggggacc 420
ccccgtggg gaaccccggg ggtgatgccc cattagtcaa tgtctttgat ctcgactttg 480
tgcttcagtg gcctgcatgt caccctttc aatctgaact gcccttgggg atctgatata 540
agcaggtcat ttaaagatct gctgaatgcc accttgaat ttgagaattc caaccagtca 600
ccaaatztat caagtgaacg gatcaactgc tctttgtgta gatcataaac gaggacaaag 660
tcctcttgc gaaataatat tgtttgtgat gttgtttta gataaggcca tagttggett 720
aataaggttt ccacactatc aatgtcctct agtgctccaa ttgccttgac tatgacatcc 780
ccagacaact caactctata tgttgacaac ctttcattac ctctgtaaaa gataccctct 840
ttcaagacaa gaggttctcc tgggttatct ggcccaatga ggtcataatgc atacttgta 900
cttagttcag aataaaagtc accaaagttg aacttaacat ggctcagaat attgtcatca 960
tttgtgcgag cgtagcctgc atcaataaac aagccagcta ggtcaaagct ctcatggcct 1020
gtgaacaatg gtaggctagc gataaccagt gcaccatcca acaatgagtg gcttccctca 1080
gaccagaaa cacattgact cattgcatcc acattcagct ctaattcagg ggtaccgaca 1140
tcaccactc ctagtgaact gacaatggtg taactgtaca ccatctttct tctaagtta 1200
aattttgtcg aaactcgtgt gtgttctact tgaatgatca attttagttt cacagcttct 1260
tggcaagcaa cattgcgcaa cacagtgtgc aggtccatca tgtcttctg aggcaacaag 1320
gagatgttgt caacagagac accctcaagg aaaacctga tattatcaaa gctagaaact 1380
acataacca ttgcaatgtc ttcaacaaac attgctcttg atactttatt attcctaact 1440
gacaaggtaa aatctgtgag ttcagctaga tctacttgac tgtcatcttc tagatctaga 1500
acttcattga accaaaagaa ggatttgaga cacgatgttg acatgactag tgggtttatc 1560
atcgaagata agacaacttg caccatgaag ttctgcaaa ctgctgtgg gctgatgcca 1620
acttcccaat ttgtatactc tgactgtcta acatggctg aagcgcaatc actctgtttc 1680
acaatataaa cattattatc tcttactttc aataagtgc ttataatccc taagttttca 1740
ttcatcatgt cttagaccac acagacatct agaaacttga gtcttccact atccaaagat 1800
ctgttcactt gaagatcatt cataaaggt gccaaatgt cttcaaatag tttggggtaa 1860
tttcttcgta tagaatgcaa tacatggttc atgcctaatt ggtcttctat ctgtcgtact 1920
gctttgggtt taacagccca gaagaaatc ttattacata agaccagagg ggcctgtgga 1980
ctcttaatag cagaaaacac ccactcccct aactcacagg catttgcag caccaaagag 2040
aagtaatccc acaaaattgg tttagaaaat tggttaactt cttaagtga tttttgacag 2100
taaataactt taggctttct ctcaaaaatt ccacaaagac atggcattat tcgagtaaat 2160
atgccttta tatacagaaa tccgccttta ccatccctaa cacacttact cccatactc 2220

ES 2 811 093 T3

ttacaaaacc caatgaagcc tgaggcaaca gaagactgaa atgcagattt gttgattgac 2280
 tctgccaaga tcttcttcac gccttttgtg aaatttcttg acagcctgga ctgtattgtc 2340
 cttatcaatg ttggcatctc ttctttctct aacactcttc gacttgtcat gagtttggtc 2400
 ctcaagacca acctcaagtc cccaaagctc gctaaattga cccatctgta gtctagagtt 2460
 tgtctgattt catcttcaact acacccggca tattgcagga atccggataa agcctcatcc 2520
 cctccctgc ttatcaagtt gataaggtt tcctcaaaga ttttgctct cttaatgtca 2580
 ttgaacactt tcctcgcgca gttccttata aacattgtct ccttatcatc agaaaaata 2640
 gcttcaattt tcctctgtag acggtaacct ctagacccat caaccagtc tttgacatct 2700
 tgttcttcaa tagctccaaa cggagtctct ctgtatccag agtatctaata caattggttg 2760
 actctaattg aaatcttga cactatatga gtgctaacc cattagcaat acattgatca 2820
 caaattgtgt ctatggtctc tgacagttgt gttggagttt tacacttaac gttgtgtaga 2880
 gcagcagaca caaacttggt gagtaaagga gtctcttcac ccatgacaaa aaatcttgac 2940
 ttaaactcag caacaaaagt tcctatcaca ctctttgggc tgataaactt gtttaattta 3000
 gaagataaga attcatgga gacacaccatt tccagcagtt ctgtcctgtc ttgaaacttt 3060
 tcatcactaa ggcaaggaat ttttataagg ctaacctggt catcgctgga ggtataagtg 3120
 acaggtatca catcatacaa taagtcaagt gcataacaca gaaattgttc agtaattagc 3180
 ccatataaat ctgatgtgtt gtgcaagatt ccctggcca tgtccaagac agacattata 3240
 tggctgggga cctggtccct tgactgcaga tactggtgaa aaaactcttc accaacta 3300
 gtacagtcac aaccattaa acctaaagat ctcttcaatt tcctacaca gtaggcttct 3360
 gcaacattaa ttggaacttc aacgacctta tgaagatgcc atttgagaat gttcattact 3420
 ggttcaagat tcaccttctg tctatctctg ggattcttca attctaattg gtacaaaaa 3480
 gaaaggaaaa gtgctgggct catagttggt cccatttgg agtggcata tgaacaggac 3540
 aagtcacat tgtaacagc cattttcata tcacagattg cacgttcgaa ttcctttct 3600
 gaattcaagc atgtgtattt cattgaacta cccacagctt ctgagaagtc ttcaactaac 3660
 ctggtcatca gcttagtgtt gaggtctccc acatacagtt ctctatttga gccaacctgc 3720
 tccttataac ttagtccaaa tttcaagttc cctgtatttg agctgatgct tgtgaactct 3780
 gtaggagagt cgtctgaata gaaacataaa ttccgtaggg ctgcatttgt aaaataactt 3840
 ttgtctagct tatcagcaat ggcttcagaa ttgctttccc tggactaag ccgaacctca 3900
 tcctttagtc tcagaacttc actggaaaag cccaatctag atctacttct atgctcataa 3960
 ctaccaatt tctgatcata atgtccttga attaaaagat acttgaagca ttcaaagaat 4020
 tcatcttctt ggtaggctat tgttgtcaaa ttttttaata acaaaccba agggcagatg 4080

ES 2 811 093 T3

tcctgcggtg cttcaagaaa ataagtcaat ttaaattggag atagataaac agcatcacat 4140
 aactctttat acacatcaga cctgagcaca tctggatcaa aatccttcac ctcatgcatt 4200
 gacacctctg ctttaactctc tctcaaacact ccaaaaagggg cccacaatga ctcaagagac 4260
 tctcgctcat caacagatgg attttttgat ttcaacttgg tgatctcaac ttttgtcccc 4320
 tcactattag ccatcttggc tagtgtcatt tgtacgtcat ttctaatacc ctcaaaggcc 4380
 cttacttgat cctctgttaa actctcatac atcactgata attcttcttg attggttctg 4440
 gttcttgaac cgggtgtcac aagacctggt agatttttta atattaagta gtccatggaa 4500
 tcaggatcaa gattatacct gccttttggc ttaaacctct cagccatagt agaaacgcat 4560
 gttgaaacaa gtttctcctt atcataaaca gaaagaatat ttccaagtcc gtcgagcttg 4620
 gggattacca cacttttatt gcttgacaga tccagagctg tgctagtgat gttaggcctg 4680
 tagggattgc ttttcagttc acctgtaact ttaagtcttc ctctattgaa gagagaaatg 4740
 cagaaggaca aaatctcttt acacactcct ggaatttgag tatctgagga agtcttagcc 4800
 tctttggaaa agaactctgtc caatcctctt atcatggtgt cctcttgttc cagtgttaga 4860
 ctcccactta gagggggggt tacaacaaca caatcaaact tgactttggg ctcaataaac 4920
 ttctcaaac actttatttg atctgtcagg cgatcagggtg tctctttggt taccaagtga 4980
 cacagataac taacatttaa tagatattta aaccttcttg caaagtaaag atctgcatct 5040
 tccccttcac ccaaaaattgt ctggaaaagt tccacagcca tcctctgaat cagcacctct 5100
 gatccagaca tgcagtcgac ccttaacttt gacatcaaat ccacatgatg gatttgattt 5160
 gcatatgcca tcaagaaata tcttagacct tgtaaaaaatg tctggttcct tttggaaggg 5220
 gaacagagta cagctaacac taacaatctt aatattggcc ttgtcattgt catgagttcg 5280
 tggctaaaat ccaaccagct ggtcatttcc tcacacattt caattaacac atcctccgaa 5340
 aatataggca ggaaaaatct ctttgatca cagtaaaaag agccttgttc ttccaatacc 5400
 ccattgatgg atagatagat agaatagcac ctgacttct cacctgtttt ttggtaaaac 5460
 aagagaccaa atgtattctt tgtcagatga aatccttgta cataacactc tcttagtcta 5520
 acattcccaa aatatctaga atactctctt tcattgatta acaatcggga ggaaaatgat 5580
 gtcttcatcg agttgaccaa tgcaagggaa atggaggaca aaatcctaaa taatttcttc 5640
 tgctcacctt ccactaagct gctgaatggc tgatgtctac agattttctc aaattccttg 5700
 ttaatagtat atctcatcac tggctctgtca gaaacaagtg cctgagctaa aatcatcaag 5760
 ctatccatat caggggtgtt tattagtttt tccagctgtg accagagatc ttgatgagag 5820
 ttcttcaatg ttctggaaca cgcttgaacc cacttggggc tggatcatcaa tttcttctt 5880
 attagtttaa tcgcctccag aatatctaga agtctgtcat tgactaacat taacatttgt 5940
 ccaacaacta ttcccgcatt tcttaacctt acaattgcat catcatgcgt tttgaaaaga 6000

ES 2 811 093 T3

tcacaaagta aattgagtaa aactaagtcc agaaacagta aagtgtttct cctgggtgttg 6060
 aaaactttta gacctttcac tttgttacac acggaagg gctgaagata acacctctct 6120
 acagcatcaa tagatataga attctcatct gactggcttt ccatggtgac ttcattctatt 6180
 ggatgcaatg cगतगगता गतततततत atcaacttgt ttgcacaaaa agggcagctg 6240
 ggcacatcac tgtctttgtg gcttcctaata aagatcaagt catttataag cttagacttt 6300
 tgtgaaaatt tgaatttccc caactgcttg tcaaaaatct ccttcttaa ccaaacctt 6360
 aactttatga gttcttctct tatgacagat tctctaagt ctctctaac cccaacaaag 6420
 agggattcat ttaacctctc atcataacct aaagaattct ttttcaagca ttcgatgttt 6480
 tctaatacca agctctgggt ttttgtgttg gacaaactat ggatcaatcg ctgggtattct 6540
 tgttcttcaa tattaatctc ttgcataaat tttgatttct ttaggatgtc gatcagcaac 6600
 caccgaactc tttcaacaac ccaatcagca aggaatctat tgctgtagct agatctgcca 6660
 tcaaccacag gaaccaacgt aatccctgcc cttagtaggt cggactttag gtttaagagc 6720
 tttgacatgt cactcttcca ttttctctca aactcatcag gattgaccct aacaaggtt 6780
 tccaatagga tgagtgtttt ccctgtgagt ttgaagccat ccggaatgac ttttggaagg 6840
 gtgggacata gtatgccata gtcagacagc atcacatcaa caaacttctg atctgaattg 6900
 atctgacagg cgtgtgcctc acaggactca agctctacta aacttgacag aagtttgaac 6960
 ccttccaaca acagagagct ggggtgatgt tgagataaaa agatgtccct ttggtatgct 7020
 agctcctgtc tttctggaaa atgctttcta ataaggcttt ttatttcatt tactgattcc 7080
 tccatgctca agtgccgcct aggatcctcg gtgcg 7115

<210> 24

<211> 224

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de un autoantígeno P1A derivado de mastocitoma de ratón P815

<400> 24

Met Ser Asp Asn Lys Lys Pro Asp Lys Ala His Ser Gly Ser Gly Gly
 1 5 10 15

Asp Gly Asp Gly Asn Arg Cys Asn Leu Leu His Arg Tyr Ser Leu Glu
 20 25 30

Glu Ile Leu Pro Tyr Leu Gly Trp Leu Val Phe Ala Val Val Thr Thr
 35 40 45

ES 2 811 093 T3

Ser Phe Leu Ala Leu Gln Met Phe Ile Asp Ala Leu Tyr Glu Glu Gln
50 55 60

Tyr Glu Arg Asp Val Ala Trp Ile Ala Arg Gln Ser Lys Arg Met Ser
65 70 75 80

Ser Val Asp Glu Asp Glu Asp Asp Glu Asp Asp Glu Asp Asp Tyr Tyr
85 90 95

Asp Asp Glu Asp Asp Asp Asp Asp Ala Phe Tyr Asp Asp Glu Asp Asp
100 105 110

Glu Glu Glu Glu Leu Glu Asn Leu Met Asp Asp Glu Ser Glu Asp Glu
115 120 125

Ala Glu Glu Glu Met Ser Val Glu Met Gly Ala Gly Ala Glu Glu Met
130 135 140

Gly Ala Gly Ala Asn Cys Ala Cys Val Pro Gly His His Leu Arg Lys
145 150 155 160

Asn Glu Val Lys Cys Arg Met Ile Tyr Phe Phe His Asp Pro Asn Phe
165 170 175

Leu Val Ser Ile Pro Val Asn Pro Lys Glu Gln Met Glu Cys Arg Cys
180 185 190

Glu Asn Ala Asp Glu Glu Val Ala Met Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu
195 200 205

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Met Gly Asn Pro Asp Gly Phe Ser Pro
210 215 220

REIVINDICACIONES

1. Una partícula de arnavirus trisegmentada infecciosa y competente para la replicación que comprende un segmento L y dos segmentos S, en donde uno de los dos segmentos S se selecciona del grupo que consiste en:
- (i) un segmento S, en donde el ORF que codifica la NP está bajo el control de una 5' UTR de arnavirus;
 - 5 (ii) un segmento S, en donde el ORF que codifica la proteína Z está bajo el control de una 5' UTR de arnavirus;
 - (iii) un segmento S, en donde el ORF que codifica la proteína L está bajo el control de una 5' UTR de arnavirus;
 - (iv) un segmento S, en donde el ORF que codifica la GP está bajo el control de una 3' UTR de arnavirus;
 - (v) un segmento S, en donde el ORF que codifica la L está bajo el control de una 3' UTR de arnavirus; y
 - (vi) un segmento S, en donde el ORF que codifica la proteína Z está bajo el control de una 3' UTR de arnavirus,
- 10 en donde la partícula de virus trisegmentada comprende dos ORF heterólogos.
2. Una partícula de arnavirus trisegmentada infecciosa y competente para la replicación que comprende dos segmentos L y un segmento S, en donde uno de los dos segmentos L se selecciona del grupo que consiste en:
- (i) un segmento L, en donde el ORF que codifica la GP está bajo el control de una 5' UTR de arnavirus;
 - (ii) un segmento L, en donde el ORF que codifica la NP está bajo el control de una 5' UTR de arnavirus;
 - 15 (iii) un segmento L, en donde el ORF que codifica la proteína L está bajo el control de una 5' UTR de arnavirus;
 - (iv) un segmento L, en donde el ORF que codifica la GP está bajo el control de una 3' UTR de arnavirus;
 - (v) un segmento L, en donde el ORF que codifica la NP está bajo el control de una 3' UTR de arnavirus; y
 - (vi) un segmento L, en donde el ORF que codifica la proteína Z está bajo el control de una 3' UTR de arnavirus,
- en donde la partícula de virus trisegmentada comprende dos ORF heterólogos.
- 20 3. La partícula de arnavirus trisegmentada de la reivindicación 1, en donde la recombinación entre segmentos de los dos segmentos S, que une dos ORF de arnavirus en solo uno en lugar de dos segmentos separados, suprime la actividad del promotor viral.
4. La partícula de arnavirus trisegmentada de la reivindicación 2, en donde la recombinación entre segmentos de los dos segmentos L, que une dos ORF de arnavirus en solo uno en lugar de dos segmentos separados, suprime la actividad del promotor viral.
- 25 5. La partícula de arnavirus trisegmentada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la propagación de la partícula de arnavirus trisegmentada no da como resultado una partícula viral bisegmentada competente para la replicación después de 70 días de infección persistente en ratones que carecen de receptor de interferón tipo I, receptor de interferón tipo II y gen activador de recombinación 1 (RAG1) y que han sido infectados con 10⁴ PFU de la partícula de arnavirus trisegmentada.
- 30 6. La partícula de arnavirus trisegmentada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la 3' UTR de arnavirus es la 3' UTR del segmento S de arnavirus o del segmento L de arnavirus, y en donde la 5' UTR de arnavirus es la 5' UTR del segmento S de arnavirus o del segmento L de arnavirus.
7. La partícula de arnavirus trisegmentada de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 5 y 6, en donde los dos segmentos S comprenden dos ORF heterólogos.
- 35 8. La partícula de arnavirus tri segmentada de una cualquiera de las reivindicaciones 2, 4, 5 y 6, en donde los dos segmentos L comprenden dos ORF heterólogos.
9. La partícula de arnavirus tri segmentada de la reivindicación 7 u 8, en donde al menos un ORF heterólogo codifica un antígeno (i) derivado de un organismo infeccioso, tumor o alergeno; o (ii) seleccionados de antígenos del virus de inmunodeficiencia humana, antígenos del virus de la hepatitis C, antígenos del virus de la varicela zóster, antígenos del citomegalovirus, antígenos de mycobacterium tuberculosis y antígenos asociados a tumores.
- 40 10. La partícula de arnavirus tri segmentada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde al menos un ORF heterólogo codifica una proteína fluorescente.
11. La partícula de arnavirus trisegmentada de la reivindicación 10, en donde la proteína fluorescente es proteína verde fluorescente (GFP) o proteína roja fluorescente (RFP).
- 45

12. La partícula de arnavirus trisegmentada de la reivindicación 11, en donde los dos ORF heterólogos codifican cada uno GFP.
13. La partícula de arnavirus trisegmentada de la reivindicación 11, en donde un ORF heterólogo codifica GFP y un ORF heterólogo codifica RFP.
- 5 14. La partícula de arnavirus trisegmentada de la reivindicación 1, en donde un primer segmento S está preparado por ingeniería para portar un ORF que codifica GP en una posición bajo el control de una 3' UTR de arnavirus y un ORF heterólogo que codifica un primer gen de interés en una posición bajo el control de una 5' UTR de arnavirus y un segundo segmento S está preparado por ingeniería para portar un ORF que codifica NP en una posición bajo el control de una 3' UTR de arnavirus y un ORF heterólogo que codifica un segundo gen de interés en una posición
10 bajo el control de una 5' UTR de arnavirus.
15. La partícula de arnavirus trisegmentada de la reivindicación 1, en donde un primer segmento S está preparado por ingeniería para portar un ORF que codifica GP en una posición bajo el control de una 5' UTR de arnavirus y un ORF heterólogo que codifica un primer gen de interés en una posición bajo el control de una 3' UTR de arnavirus y un segundo segmento S está preparado por ingeniería para portar un ORF que codifica NP en una posición bajo el control de una 5' UTR de arnavirus y un ORF heterólogo que codifica un segundo gen de interés en una posición
15 bajo el control de una 3' UTR de arnavirus.
16. La partícula de arnavirus trisegmentada de la reivindicación 14 o 15, en donde el gen de interés codifica un antígeno (i) derivado de un organismo infeccioso, tumor o alérgico; o (ii) seleccionados de antígenos del virus de inmunodeficiencia humana, antígenos del virus de la hepatitis C, antígenos del virus de la varicela zóster, antígenos del citomegalovirus, antígenos de mycobacterium tuberculosis y antígenos asociados a tumores.
20
17. La partícula de arnavirus trisegmentada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en donde la partícula de arnavirus trisegmentada deriva de LCMV.
18. Un ADNc del genoma de la partícula de arnavirus trisegmentada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17.
- 25 19. Un vector de expresión de ADN que comprende el ADNc de la reivindicación 18.
20. Una célula huésped que comprende la partícula de arnavirus trisegmentada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, el ADNc de la reivindicación 18 o el vector de la reivindicación 19.
21. Un método para generar la partícula de arnavirus trisegmentada de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 y 5, en donde el método comprende:
- 30 (i) transfectar en una célula huésped uno o más ADNc de un segmento L y dos segmentos S;
(ii) mantener la célula huésped en condiciones adecuadas para la formación de virus; y
(iii) recoger la partícula de arnavirus.
22. Un método para generar la partícula de arnavirus trisegmentada de una cualquiera de las reivindicaciones 2, 4 y 5, en donde el método comprende:
- 35 (i) transfectar en una célula huésped uno o más ADNc de los dos segmentos L y un segmento S;
(ii) mantener la célula huésped en condiciones adecuadas para la formación de virus; y
(iii) recoger la partícula de arnavirus.
23. Una vacuna que comprende una partícula de arnavirus trisegmentada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 40 24. Una composición farmacéutica que comprende una partícula de arnavirus trisegmentada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

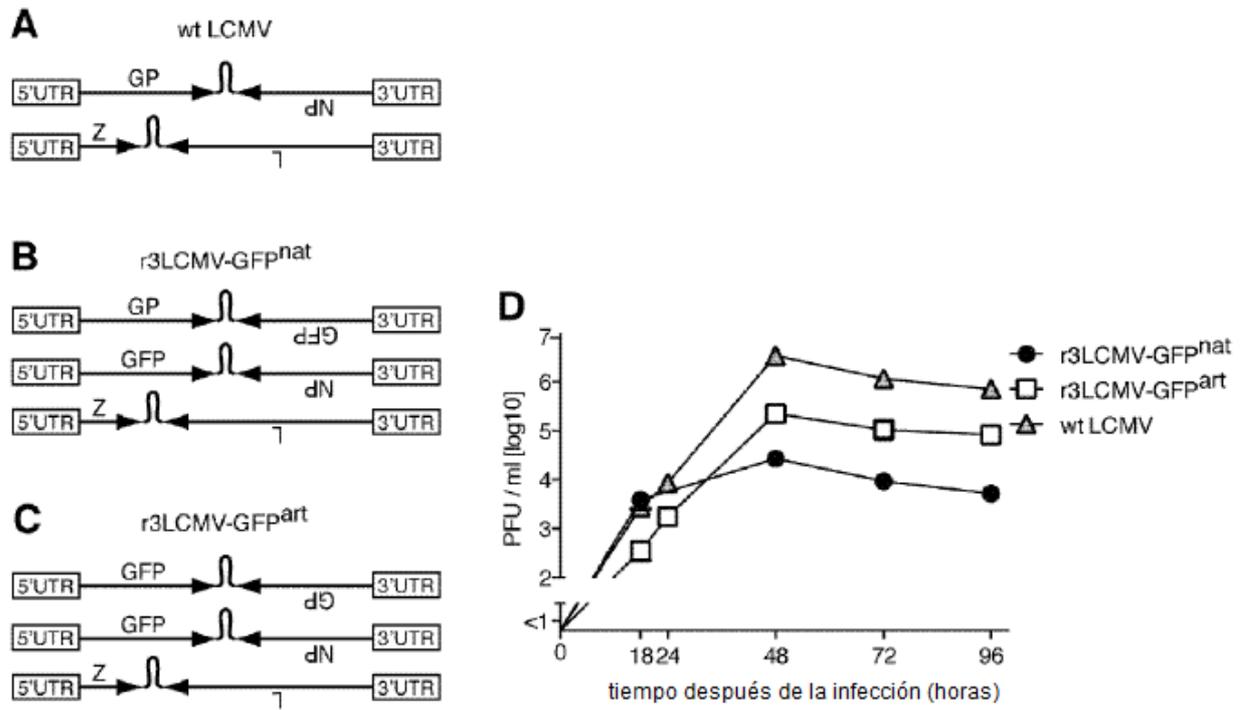


Figura 1

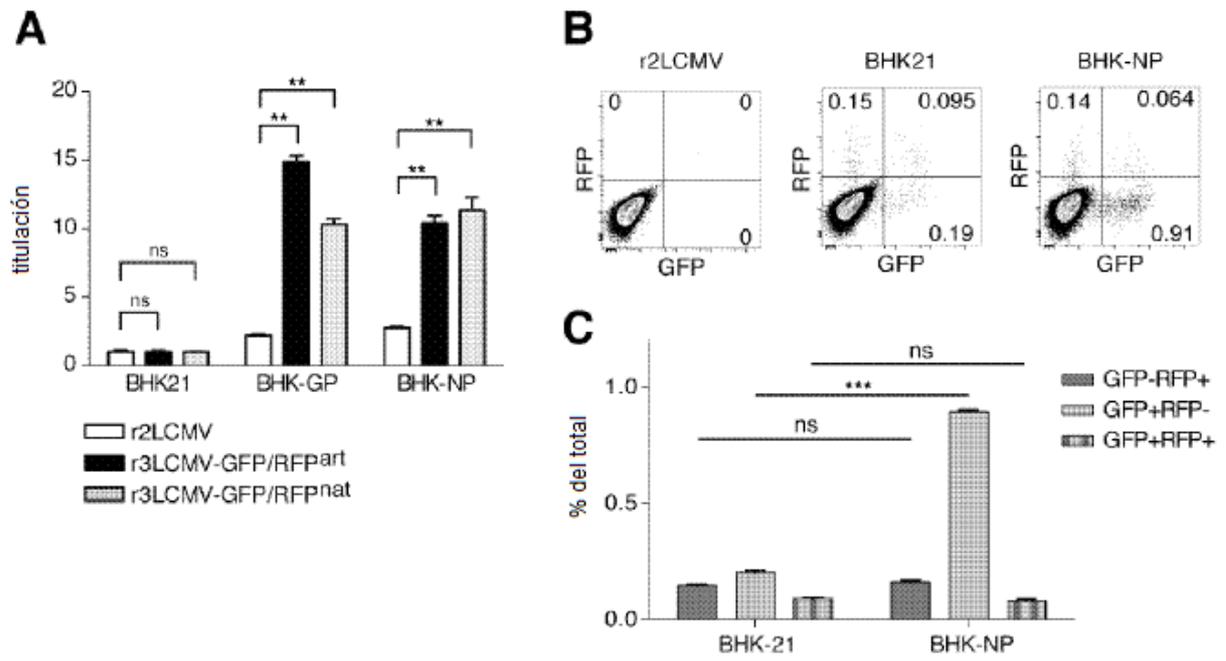


Figura 2

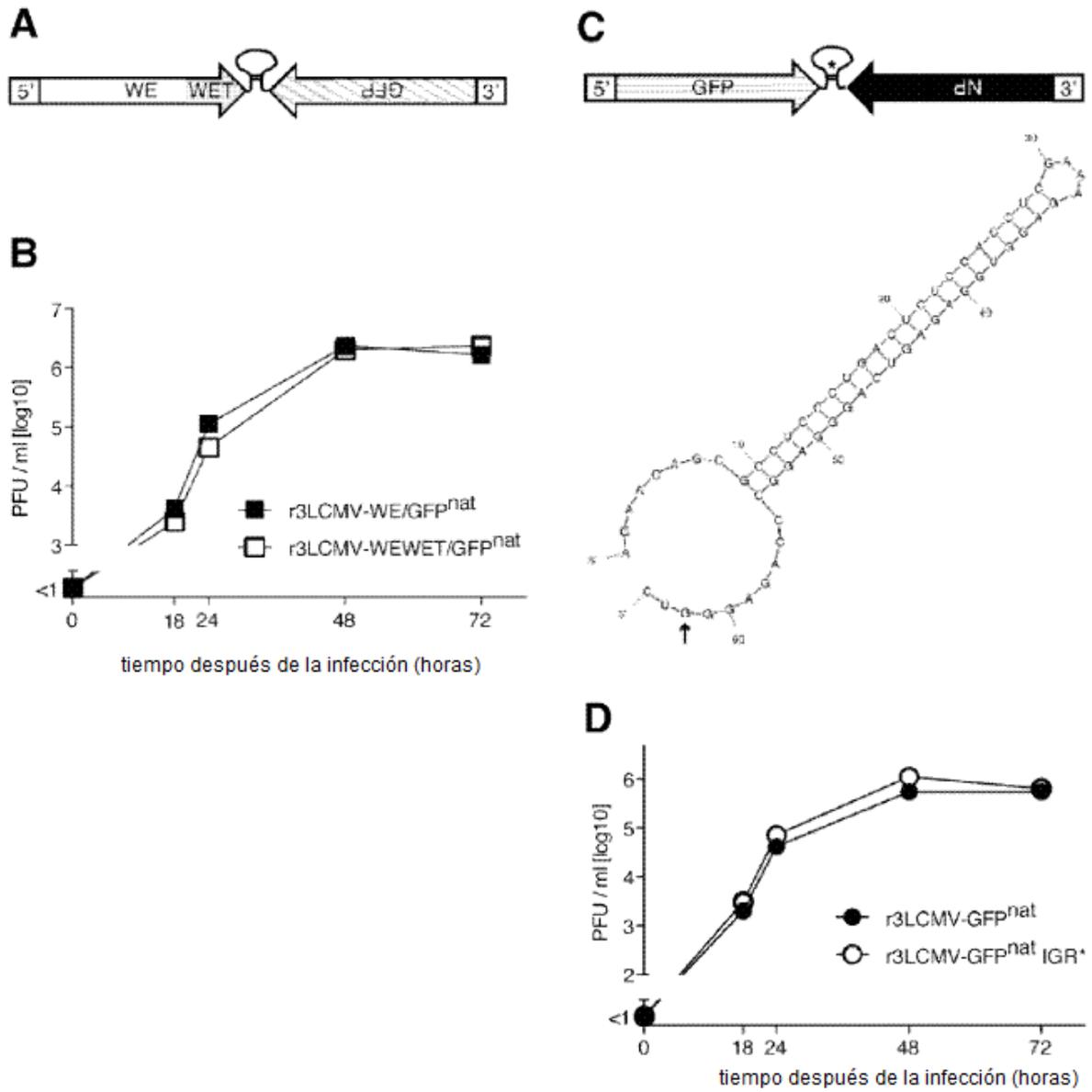


Figura 3

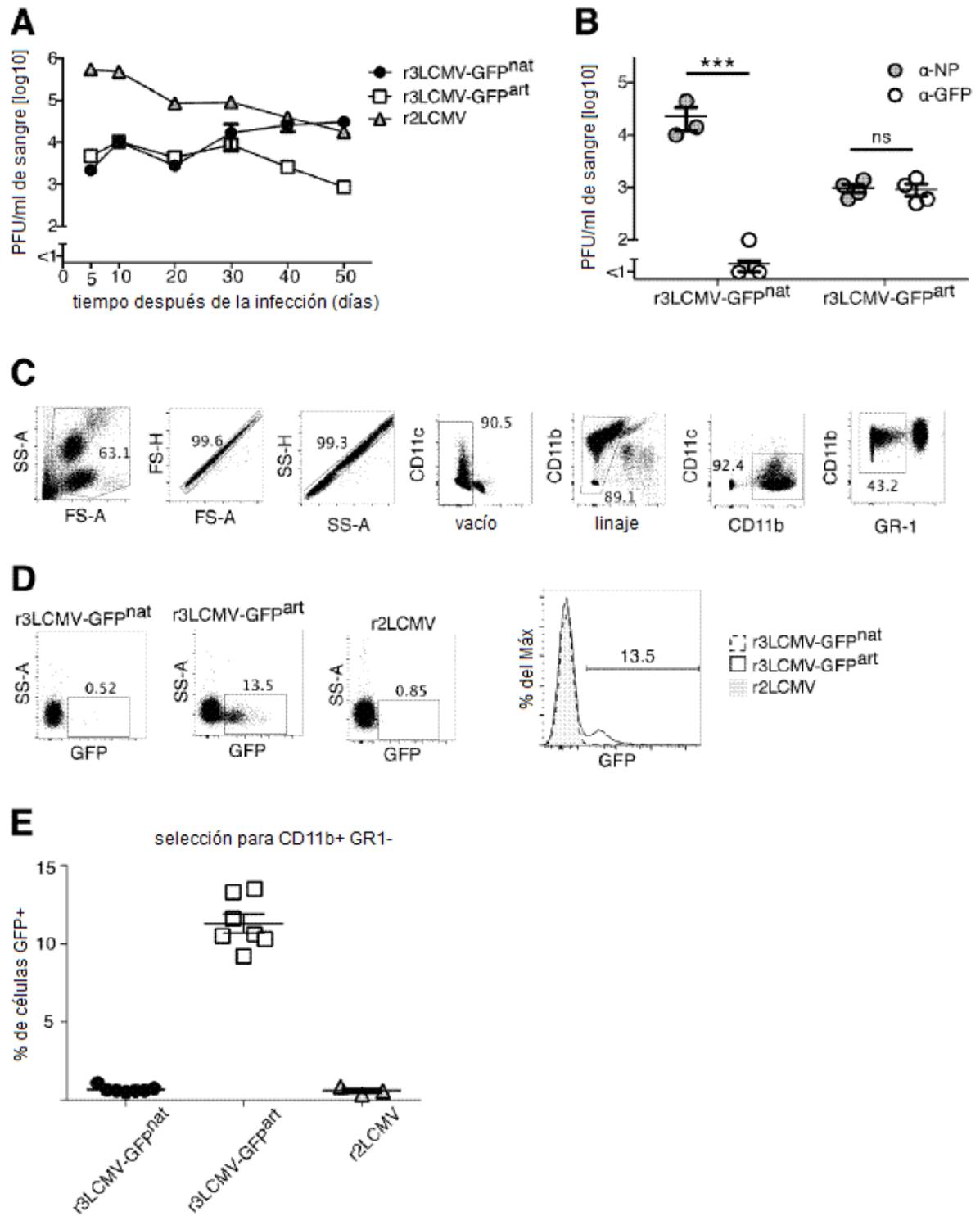


Figura 4

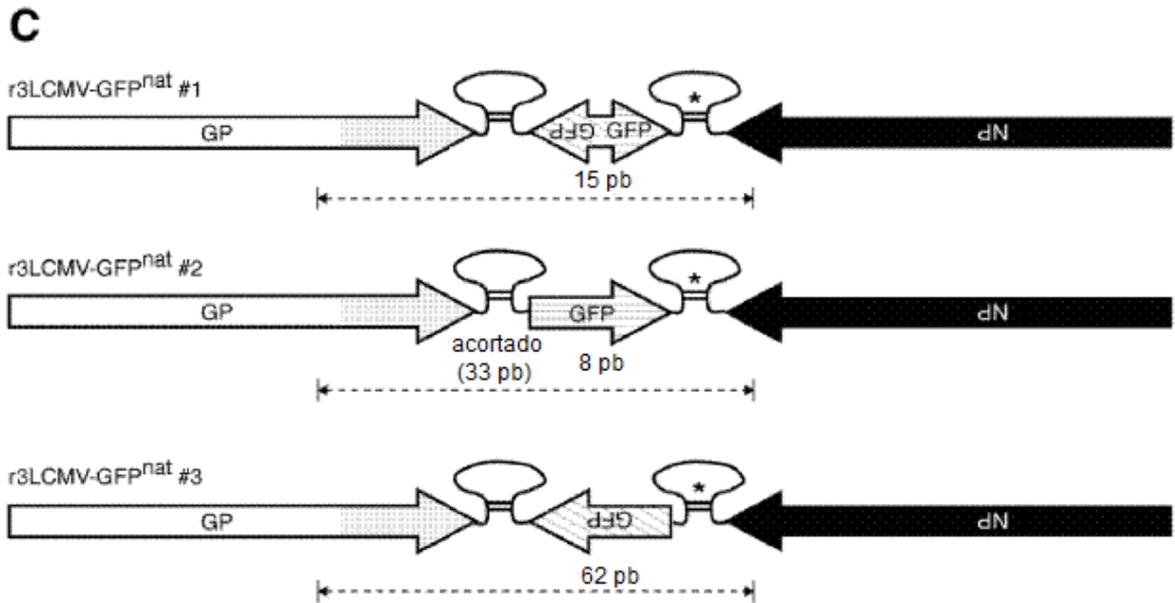
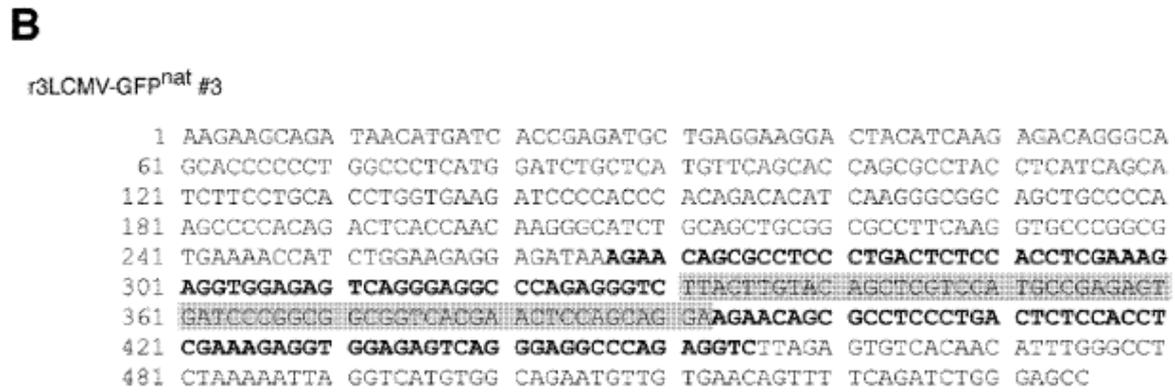
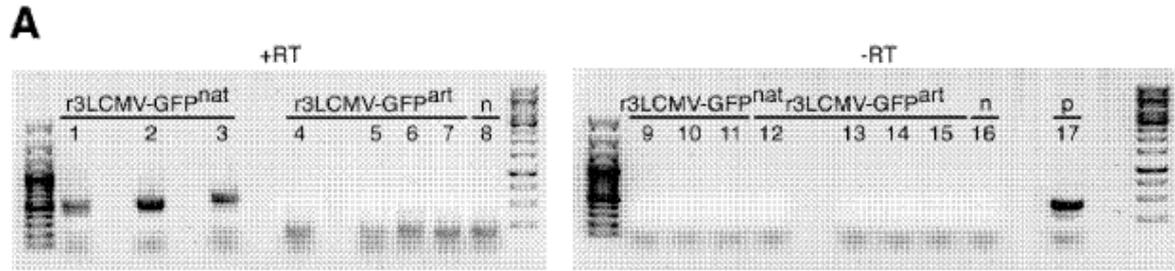


Figura 5

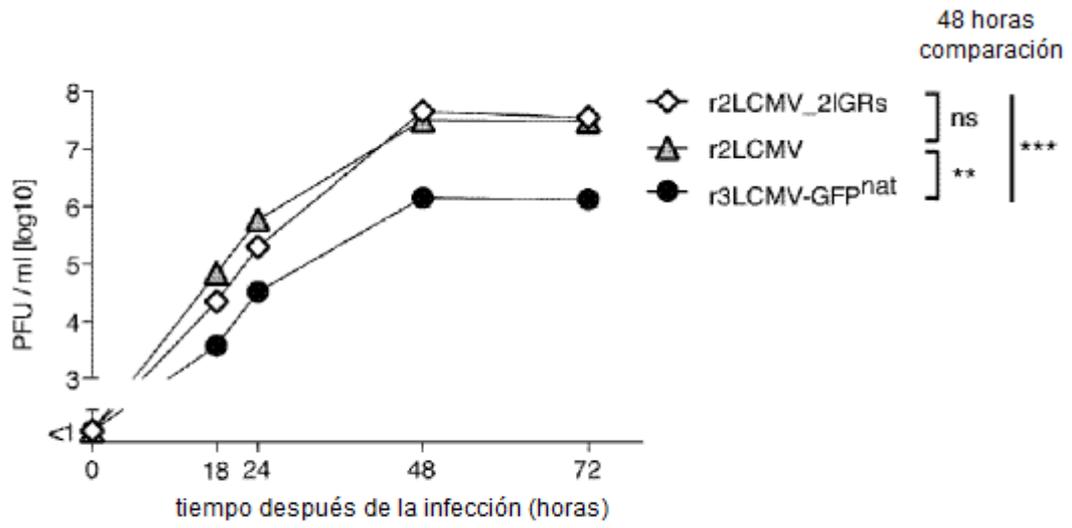


Figura 6

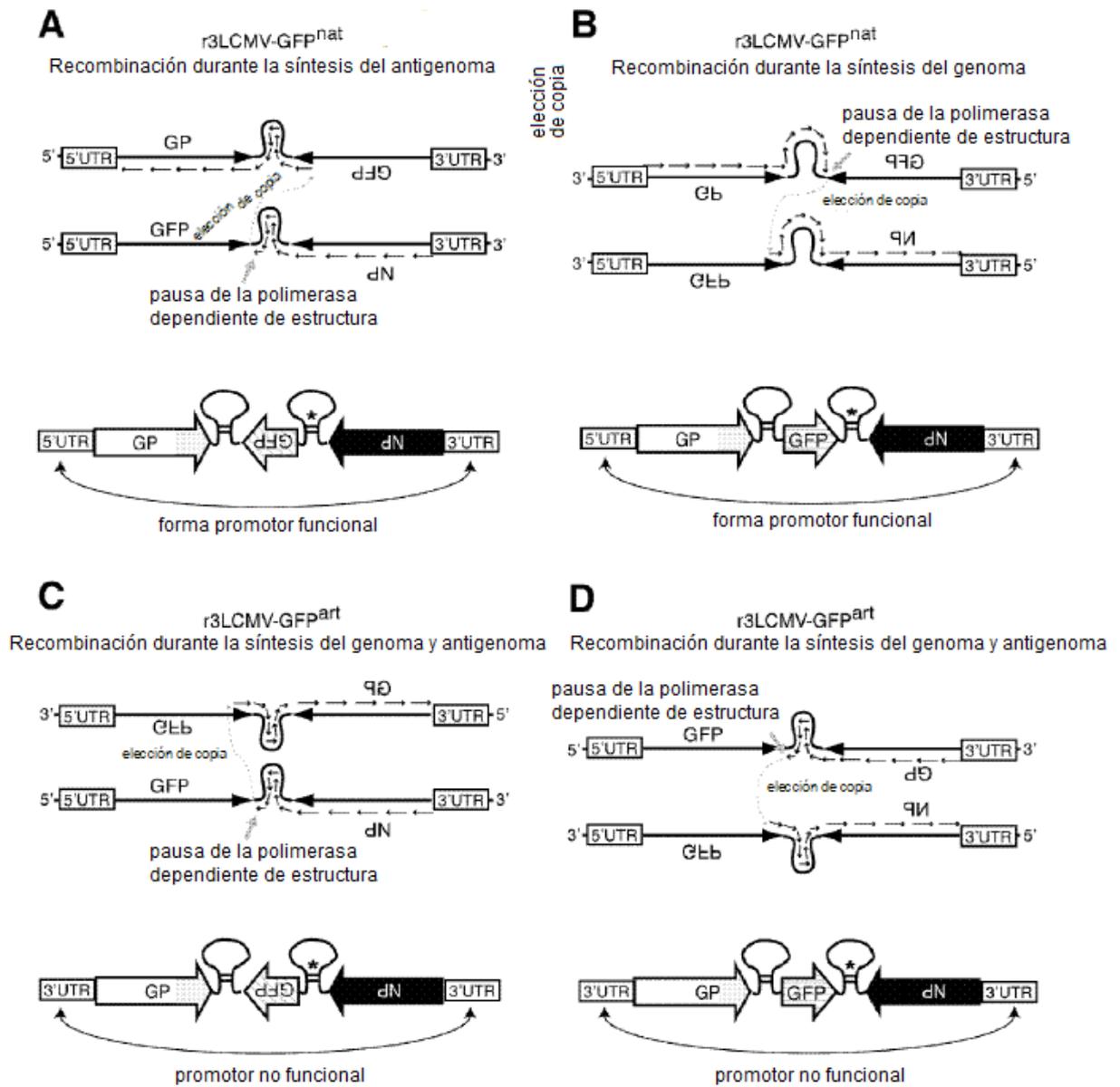


Figura 7

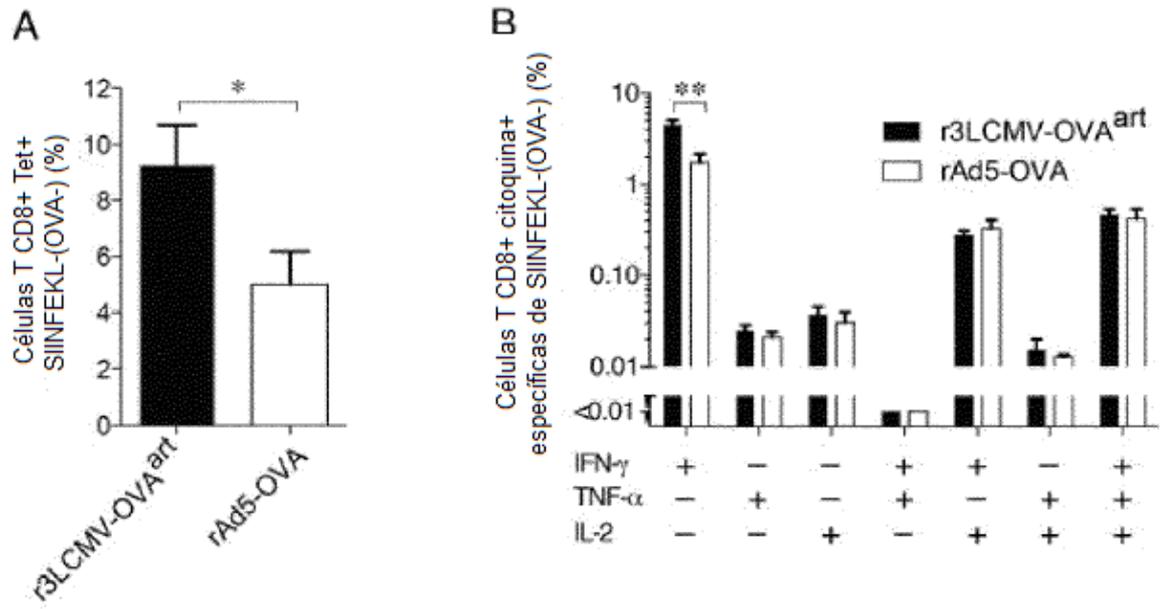


Figura 8

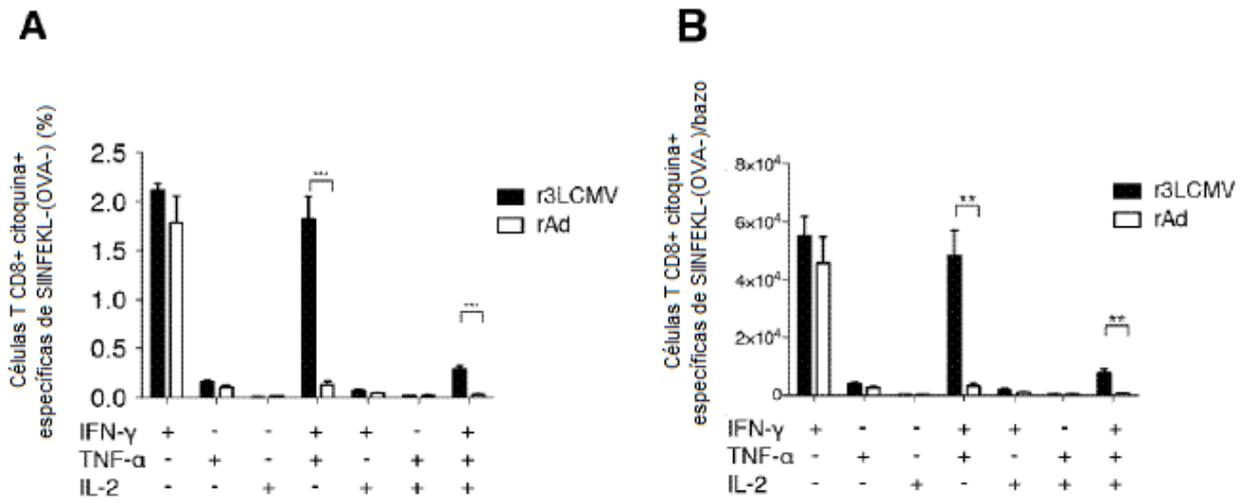


Figura 9

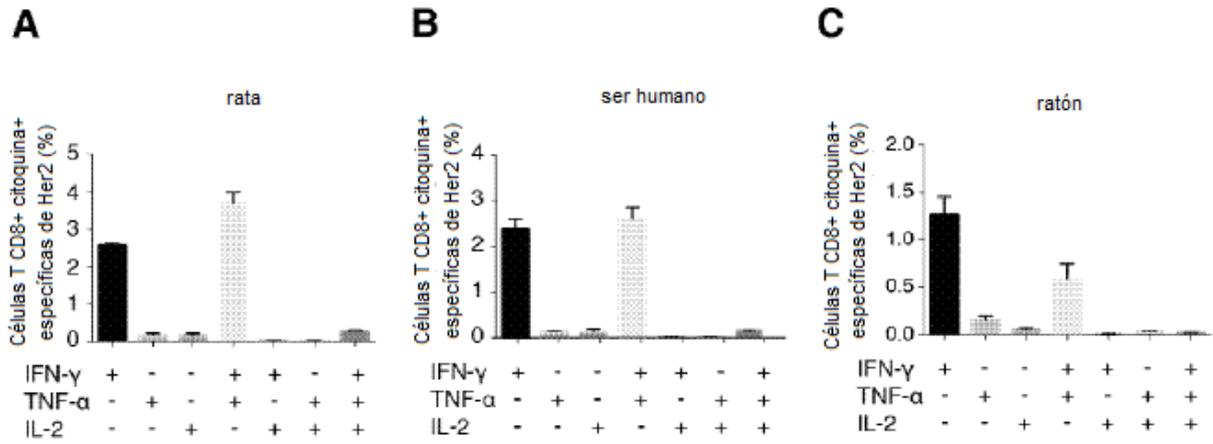


Figura 10

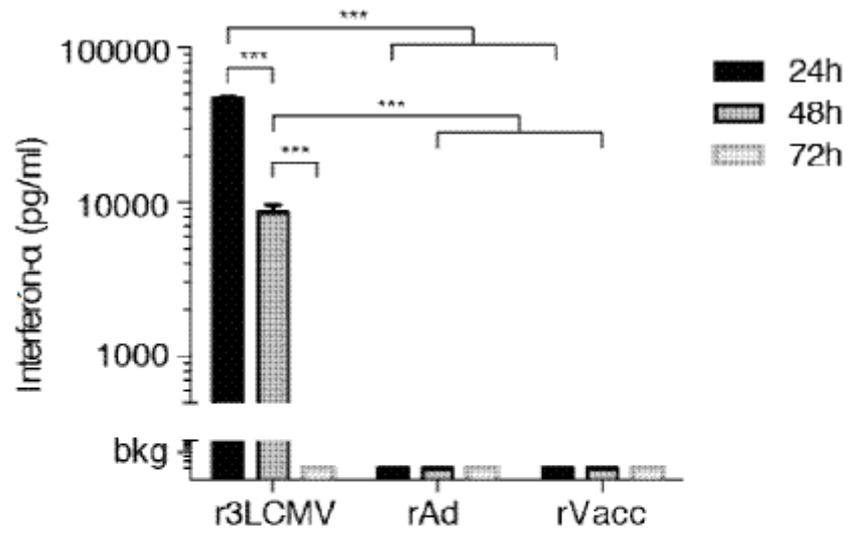


Figura 11

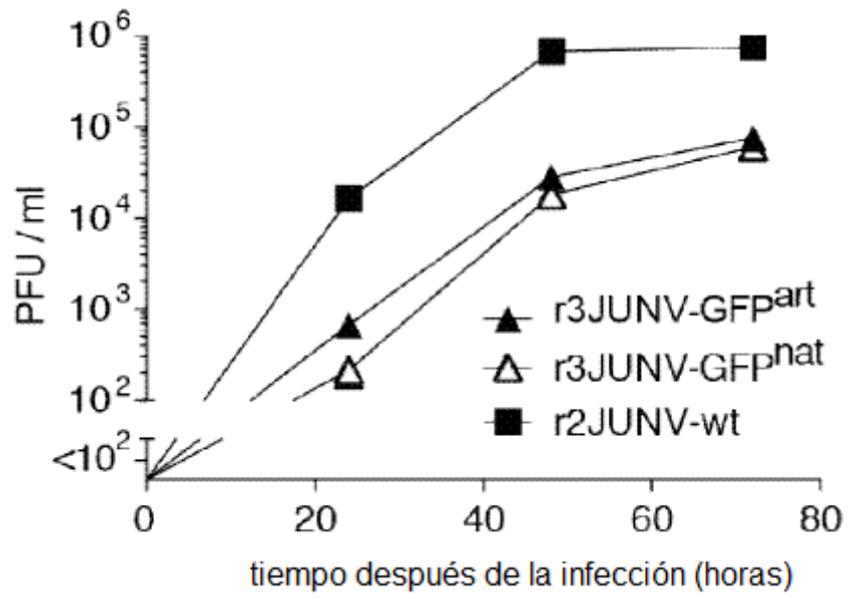


Figura 12

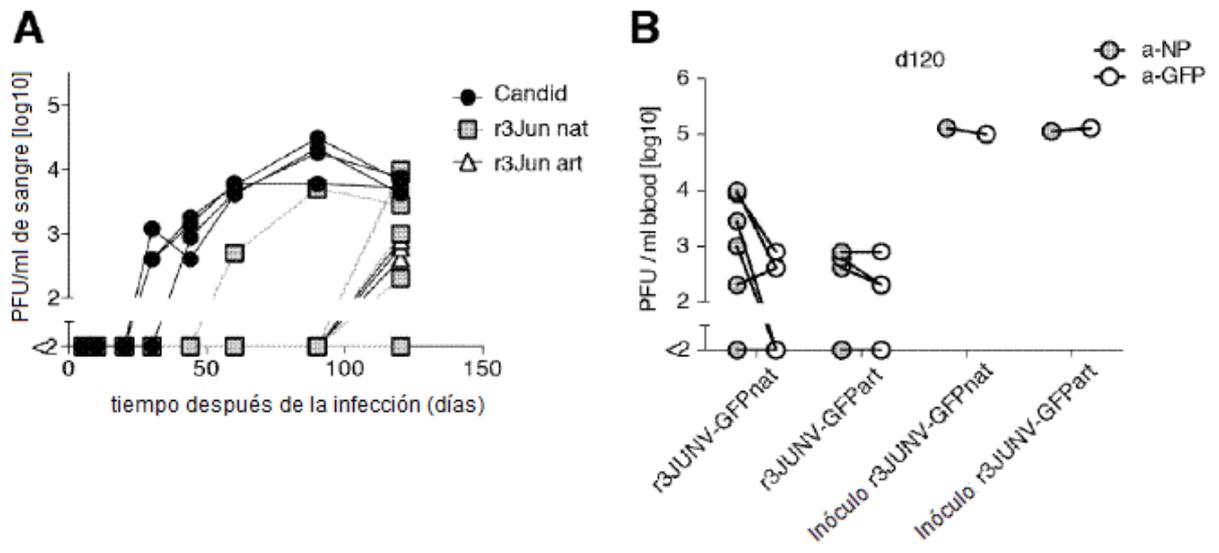


Figura 13

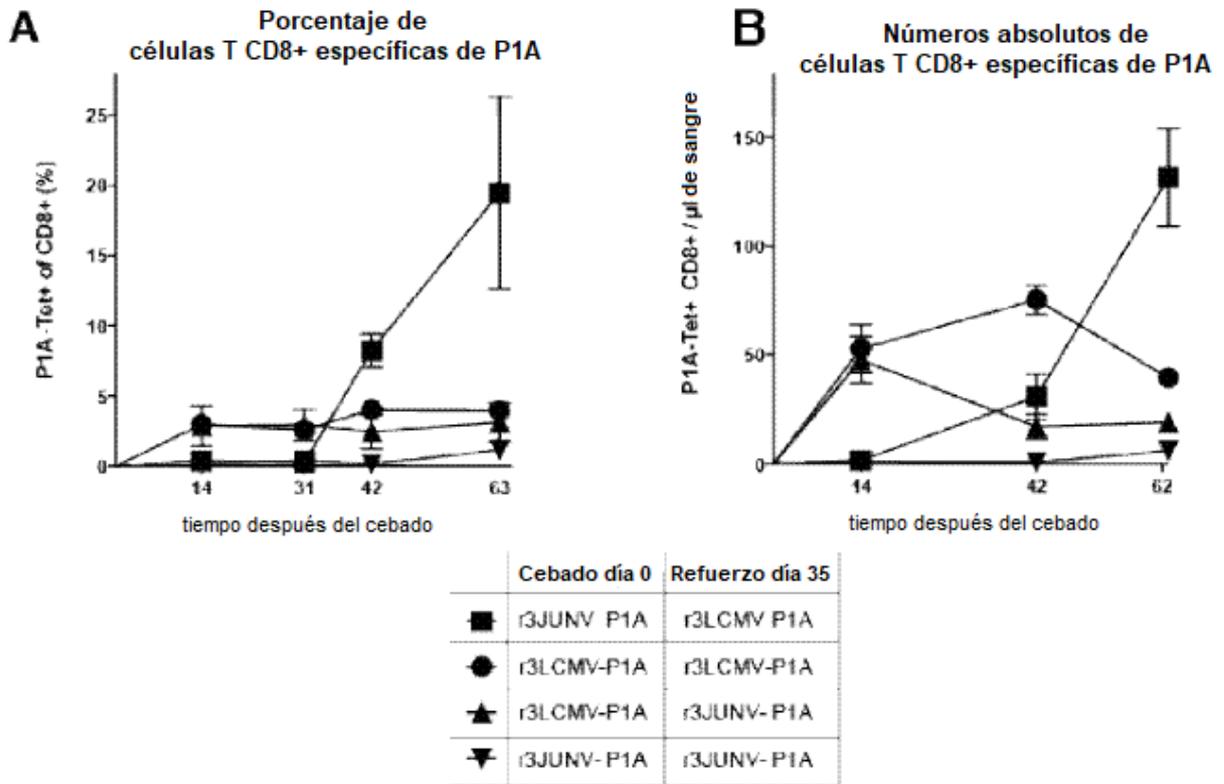


Figura 14