

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 922 981**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.11.2016 PCT/EP2016/076668**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.05.2017 WO17080920**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2016 E 16797775 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.06.2022 EP 3373959**

54 Título: **Partículas de arnavirus como vacunas contra el cáncer**

30 Prioridad:

12.11.2015 US 201562254654 P
12.11.2015 US 201562254651 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.09.2022

73 Titular/es:

HOOKIPA BIOTECH GMBH (100.0%)
Helmut-Qualtinger-Gasse 2
1030 Wien, AT

72 Inventor/es:

SCHMIDT, SARAH;
ORLINGER, KLAUS y
COHEN, KATHERINE

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 922 981 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

Partículas de arnavirus como vacunas contra el cáncer

1. Introducción

5 La presente solicitud se refiere en general a arnavirus modificados genéticamente que son vacunas adecuadas contra enfermedades neoplásicas, tales como el cáncer. Los arnavirus descritos en el presente documento pueden ser adecuados para vacunas y/o el tratamiento de enfermedades neoplásicas y/o para uso en inmunoterapias. En particular, una enfermedad neoplásica se puede tratar con métodos y composiciones que implican la administración de un arnavirus modificado genéticamente en combinación con un inhibidor de punto de control inmunitario, en donde el arnavirus se ha genomanipulado para incluir una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a un tumor o fragmento antigénico del mismo.

2. Antecedentes

2.1 Investigación del virus de la coriomeningitis linfocítica y enfermedad humana

15 El virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), un miembro de la familia arenaviridae, es un prototipo de virus de modelo de ratón en la investigación de infecciones virales. Desde su aislamiento en la década de 1930 (Rivers y McNair Scott, 1935, *Science*, 81 (2105): 439-440) los estudios que utilizan este virus han descubierto muchos conceptos clave en inmunología viral y patogénesis (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 inmunitarias, en particular en el contexto de una infección persistente. Los hospedantes naturales del LCMV son los ratones; sin embargo, varios informes pusieron de manifiesto que el LCMV también podría ser un patógeno humano desatendido (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 de los arnavirus en poblaciones de roedores de todo el mundo. Además del virus Lassa de los arnavirus del Viejo Mundo (LASV), que se puede encontrar en África, varios arnavirus del Nuevo Mundo como Junín, Guanarito o Machupo son prevalentes 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). Al transmitirse a los seres humanos, muchos de esos virus pueden causar fiebre hemorrágica viral asociada con una alta mortalidad (Geisbert y Jahrling, 2004, *Nat Med* 10(12 Suplemento): S110-121).

2.2 Organización genómica del virus de la coriomeningitis linfocítica

30 Los arnavirus son virus envueltos. 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 glicoproteína 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 anular (*RING finger*) (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 de forma no covalente (Buchmeier y Oldstone 1979, *Virology* 99(1): 111-120). Los trímeros de GP-1 y GP-2 se ensamblan como espigas en la superficie de los viriones y son esenciales para mediar la entrada en las células hospedantes por interacción con los receptores de la superficie celular. Durante mucho tiempo se afirmó que la unión y la entrada del virus en las células hospedantes eran mediadas por la interacción de la GP del LCMV con el receptor celular α -dístroglicano como el único receptor celular para el 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 no integrina que atrapa la molécula de adhesión intracelular 3 específica de células dendríticas) como receptores adicionales para el LCMV y LASV, un pariente cercano del LCMV, que permiten la entrada del LCMV en células independientemente del α -dístroglicano (Shimojima y Kawaoka 2012, *J Vet Med*, 74(10):1363-1366; Shimojima et al., 2012, *J Virol* 86(4):2067-2078). La NP se une al ARN viral, formando la nucleocápside, que sirve como molde para la proteína L viral. La nucleocápside asociada a la proteína L viral forma el llamado complejo ribonucleoproteico, que es activo tanto en la replicación como en la transcripción y representa la unidad mínima de infectividad viral. Se ha mostrado que la NP y la proteína L son los factores de acción en trans mínimos necesarios para la transcripción y replicación del ARN viral (Lee et al., 2000, *J Virol* 74(8): 3470-3477). Los dos genes de 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, dando como resultado la formación de estructuras secundarias. Se sabe que estas estructuras tipo mango de sartén (*panhandle*) sirven como promotores virales para la transcripción y la replicación, y su análisis mediante mutagénesis dirigida al sitio ha puesto de manifiesto la dependencia de la secuencia y la estructura, y no tolera ni siquiera cambios de secuencia 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 el LCMV no pueden servir directamente como

ARNm, es decir, no pueden ser traducidos cuando se introducen en las células. En consecuencia, la transfección de células con ARN viral no conduce a la producción de partículas virales infecciosas. Con el fin de generar partículas virales infecciosas de virus de ARN de cadena negativa a partir de ADNc en células permisivas cultivadas, el(los) segmento(s) de ARN viral deben complementarse en trans con los factores mínimos necesarios para la transcripción y la replicación. Con la ayuda de un sistema de minigenoma que se publicó hace varios años, finalmente se pudieron analizar los elementos virales de acción en cis y los factores de acción 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; Perez 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 arenavirus como el LASV y 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 a partir de ADNc utilizando plásmidos dirigidos por pol-I/-II o T7/pol-II, respectivamente (denominados "rescate viral") (Flatz et al., 2006, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(12): 4663-4668; Sanchez y de la Torre, 2006, *Virology* 350(2): 370-380).

2.4 LCMV recombinante que expresa genes de interés

La generación de virus recombinantes de ARN de cadena negativa que expresan genes extraños de interés se ha buscado durante mucho tiempo. Se han publicado diferentes estrategias para otros virus (Garcia-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 bisegmentadas de LCMV (Emonet et al., 2009, *PNAS*, 106(9):3473-3478). Se insertaron dos genes extraños de interés en el genoma bisegmentado de LCMV, lo que dio como resultado partículas de LCMV trisegmentadas (r3LCMV) con dos segmentos S y un segmento L. En el virus trisegmentado, publicado por Emonet et al., (2009), tanto la NP como GP se mantuvieron en sus respectivas posiciones naturales en el segmento S y, por lo tanto, se expresaron bajo sus promotores naturales en la UTR flanqueante.

2.5 Arenavirus de replicación deficiente

Recientemente, se ha mostrado que se puede genomanipular una partícula de arenavirus infecciosa para que contenga 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 modificadas genéticamente (es decir, una partícula de arenavirus infecciosa, de replicación deficiente) (Publicación internacional N.º: WO 2009/083210 A1 y Publicación Internacional N.º: WO 2014/140301 A1).

2.6 Vectores de arenavirus de replicación deficiente que expresan genes de interés

Se ha descrito el uso de arenavirus infecciosos deficientes en la replicación como vectores para la expresión de antígenos (véase Flatz et al., 2010, *Nat. Med.*, 16(3):339-345; Flatz et al., 2012, *J. Virol.*, 86(15), 7760-7770). Estos arenavirus infecciosos, deficientes en la replicación pueden infectar una célula hospedante, es decir, unirse a una célula hospedante y liberar su material genético en la célula hospedante. Sin embargo, son deficientes en la replicación, es decir, el arenavirus no puede producir más partículas de progenie infecciosas en una célula que no es de complementación, debido a una eliminación o inactivación funcional de un marco de lectura abierto (ORF) que codifica una proteína viral, tal como la proteína GP. En su lugar, el ORF se sustituye por una secuencia de nucleótidos de un antígeno de interés. En Flatz et al. 2010, los autores utilizaron arenavirus infecciosos deficientes en la replicación como vectores para expresar OVA (epítipo SIINFEKL). En Flatz et al. 2012, los autores utilizaron arenavirus deficientes en la replicación como vectores para expresar HIV/SIV Env.

La invención proporciona una partícula de arenavirus para su uso en un método para tratar una enfermedad neoplásica en un sujeto, en donde el método comprende administrar al sujeto la partícula de arenavirus y un inhibidor de punto de control inmunitario, en donde la partícula de arenavirus es una partícula de arenavirus trisegmentada que comprende un segmento L y dos segmentos S, y en donde la partícula de arenavirus está genomanipulada para contener un segmento genómico de arenavirus que comprende:

(i) una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo; y

(ii) al menos un marco de lectura abierto ("ORF") de arenavirus en una posición distinta de la posición natural del ORF, en donde el ORF codifica la glicoproteína ("GP"), la nucleoproteína ("NP"), la proteína de matriz Z ("proteína Z") o la ARN polimerasa L dependiente de ARN ("proteína L") de la partícula de arenavirus.

La invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una partícula de arenavirus, un inhibidor de punto de control inmunitario y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde la partícula de arenavirus es una partícula de arenavirus trisegmentada como se define en el presente documento en el contexto de su uso para tratar una enfermedad neoplásica según la invención.

La invención proporciona un kit que comprende uno o más envases e instrucciones de uso, en donde uno o más envases comprenden la composición farmacéutica de la invención.

La invención proporciona un kit que comprende dos o más envases e instrucciones de uso, en donde uno de los envases comprende una partícula de arnavirus y otro de los envases comprende un inhibidor de punto de control inmunitario, en donde la partícula de arnavirus es una partícula de arnavirus trisegmentada como se define en el presente documento en el contexto de su uso para el tratamiento de una enfermedad neoplásica según la invención.

- 5 La invención proporciona una composición farmacéutica de la invención, o un kit de la invención, para usar en un método para tratar una enfermedad neoplásica en un sujeto.

En el contexto de la invención, la referencia a partículas de arnavirus como tal debe entenderse como una referencia a partículas de arnavirus para su uso en el sentido anterior.

3. Sumario de la invención

- 10 En el presente documento se describen métodos y composiciones para tratar una enfermedad neoplásica utilizando una partícula de arnavirus que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo. También se describen en el presente documento métodos y composiciones para tratar una enfermedad neoplásica utilizando un inhibidor de punto de control inmunitario. Tal inhibidor de punto de control inmunitario puede inhibir, disminuir o interferir con la actividad de un regulador negativo de puntos de control. En el contexto de la invención, los métodos para tratar una enfermedad neoplásica utilizan una partícula de arnavirus que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo, y un inhibidor de punto de control inmunitario que inhibe, disminuye o interfiere con la actividad de un regulador negativo de puntos de control. En el contexto de la invención, las composiciones comprenden una partícula de arnavirus que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo, y un inhibidor de punto de control inmunitario que inhibe, disminuye o interfiere con la actividad de un regulador negativo de puntos de control.

- 15 La partícula de arnavirus en el contexto de la invención está genomanipulada para contener un segmento genómico de arnavirus que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo y al menos un marco de lectura abierto ("ORF") de arnavirus en una posición diferente de la posición natural del ORF. En ciertas realizaciones, la partícula de arnavirus es una partícula de arnavirus infecciosa, de replicación deficiente. En otras realizaciones, la partícula de arnavirus es una partícula de arnavirus trisegmentada, que puede ser de replicación deficiente o competente en la replicación. En otras realizaciones más, la partícula de arnavirus trisegmentada cuando se propaga, no da como resultado una partícula viral bisegmentada competente para la replicación.

- 20 3.1 Partículas de arnavirus que tienen marco de lectura abierto no natural

- Se usan arnavirus con reordenamientos de sus ORF en sus genomas y una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo el contexto de la invención. En una realización particular, una partícula de arnavirus incluye un segmento genómico de arnavirus que se ha genomanipulado para llevar un ORF de arnavirus en una posición distinta de la posición natural. Así, en determinadas realizaciones particulares, el segmento genómico de arnavirus comprende: una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo; y al menos un ORF de arnavirus en una posición distinta de la posición natural de dicho ORF, en donde el ORF codifica la glicoproteína ("GP"), la nucleoproteína ("NP"), la proteína de matriz Z ("proteína Z") o la ARN polimerasa L ("proteína L") dependiente de ARN de una partícula de arnavirus. Se ha transformado una partícula de arnavirus para que contenga dicho segmento genómico de arnavirus.

- En ciertas realizaciones, una partícula de arnavirus es infecciosa, es decir, es capaz de entrar o inyectar su material genético en una célula hospedante. En ciertas realizaciones más específicas, una partícula de arnavirus es infecciosa, es decir, es capaz de entrar o inyectar su material genético en una célula hospedante seguido de la amplificación y expresión de su información genética dentro de la célula hospedante. En ciertas realizaciones, la partícula de arnavirus está genomanipulada para ser una partícula de arnavirus infecciosa, de replicación deficiente, es decir, contiene 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 que no son de complementación.

- El antígeno tumoral o antígeno asociado a tumor codificado por la secuencia de nucleótidos incluida dentro de un segmento genómico de arnavirus o partícula de arnavirus puede ser uno o más de los antígenos tumorales o antígenos asociados a tumores seleccionados del grupo que consiste en antígenos virales oncogénicos, antígenos de cáncer de testículo, antígenos oncofetales antígenos, antígenos de diferenciación de tejidos, antígenos de proteínas mutantes, neoantígenos, adipofilina, AIM-2, ALDH1A1, BCLX (L), BING-4, CALCA, CD45, CPSF, ciclina D1, DKK1, ENAH (hMcna), Ga733 (EpCAM), EphA3, EZH2, FGF5, glipican-3, G250 /MN/CAIX, HER-2/neu, IDO1, IGF2B3, IL13Ralpha2, carboxil esterasa intestinal, alfa-fetoproteína, caliceína 4, KIF20A, Lengsin, M-CSF, MCSP, mdm-2, Meloe, MMP-2, MMP-7, MUC1, MUC5AC, p53 (no mutante), PAX5, PBF, PRAME, PSMA, RAGE, RAGE-1, RGS5, RhoC, RNF43, RU2AS, secernina 1, SOX10, STEAP1 (antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de la próstata 1), survivina, telomerasa, VEGF, WT1, EGF-R, CEA, CD20, CD33, CD52, glicoproteína 100 (GP100 o proteína gp 100), MELANA/MART1, MART2, NY-ESO-1, p53, MAGE A1, MAGE A3, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6,

CDK4, alfa-actinina-4, ARTC1, BCR-ABL, 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, ETV6-AML, proteína de fusión ETV6-AML1, FLT3-ITD, FN1, GPNMB, proteína de fusión LDLR-fucosiltransferasaAS, NFYC, OGT, OS-9, proteína de fusión pml-RARalpha, PRDX5, PTPRK, H-ras, K-ras (oncogén viral del sarcoma de rata V-Ki-ras2 Kirsten), N-ras, RBAF600, SIRT2, SNRPD1, SSX, SSX2, SYT-SSX1 o proteína de fusión SSX2, TGF-betaRII, triosafosfato isomerasa, ormdm-2, LMP2, HPV E6/E7, EGFRvIII (factor de crecimiento epidérmico variante III), Idiotipo, GD2, gangliósido G2), mutante Ras, p53 (mutante), proteinasa3 (PR1), tirosinasa, PSA, hTERT, puntos de corte de translocación de sarcoma, EphA2, fosfatasa ácida prostática PAP, neo-PAP, ML-IAP, AFP, ERG (gen de fusión TMPRSS2 ETS), NA17, PAX3, ALK, receptor de andrógenos, ciclina B1, ácido polisiálico, MYCN, TRP2, TRP2-Int2, GD3, Fucosil GM1, Mesotelina, PSCA, sLe(a), cyp1B1, PLAC1, GM3, BORIS, Tn, GLobH, NY-BR-1, SART3, STn, anhidrasa carbónica IX, OY-TES1, proteína espermática 17, LCK, antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMWMAA), AKAP-4, SSX2, XAGE 1, B7H3, Legumina, Tie 2, Page4, VEGFR2, MAD-CT-1, FAP, PDGFR-beta, MAD-CT-2, antígeno 1 asociado a For, TRP1, CA-125, CA19-9, calretinina, antígeno de membrana epitelial (EMA), antígeno tumoral epitelial (ETA), CD19, CD34, CD99, CD117, cromogranina, citoqueratina, desmina, proteína ácida fibrilar glial (GFAP), proteína de líquido de enfermedad quística macroscópica (GCDFP-15), antígeno HMB-45, Myo-D1, actina específica de músculo (MSA), neurofilamento, enolasa específica de neurona (NSE), fosfatasa alcalina placentaria, sinaptofisina, tiroglobulina, factor de transcripción tiroidea 1, forma dimérica de la isoenzima piruvato quinasa tipo M2 (tumor M2-PK), BAGE BAGE-1, CAGE, CTAGE, FATE, GAGE, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, HCA661, HOM-TES-85, MAGEA, MAGEB, MAGEC, NA88, NY-SAR-35, SPANXB1, SPA17, SSX, SYCP1, TPTE, carbohidrato/gangliósido GM2 (antígeno oncofetal-inmunogénico-1 OFA-I-1), GM3, CA 15-3 (CA 27.29\BCAA), CA 195, CA 242, CA 50, CAM 43, CEA, EBNA, EF2, antígeno del virus de Epstein-Barr, HLA-A2, HLA-A11, HSP70-2, KIAA0205, MUM-1, MUM-2, MUM-3, miosina clase I, GnTV, Herv- K-mel, LAGE-1, LAGE-2, (proteína espermática) SP17, SCP-1, P15(58), Hom/Mel-40, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR, TSP-180, P185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23H1, TAG-72, TAG-72-4, CA-72-4, CAM 17.1, NuMa, 13-catenina, P16, TAGE, CT7, 43-9F,5T4, 791Tgp72, 13HCG, BCA225, BTAA, CD68\KP1, CO-029, HTgp-175, M344, MG7-Ag, MOV18, NB\70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90, TAAL6, TLP, TPS, CD22, CD27, CD30, CD70, prosteina, TARP (proteína del marco de lectura alternativo gamma del receptor de células T), Trp-p8, integrina $\alpha\beta 3$ (CD61), galactina o Ral-B, CD123, CLL-1, CD38, CS-1, CD138 y ROR1. En ciertas realizaciones, la secuencia de nucleótidos codifica dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más antígenos tumorales, antígenos asociados a tumores o fragmentos antigénicos de los mismos. En determinadas realizaciones, un fragmento antigénico de un antígeno tumoral o antígeno asociado a tumor es codificado por la secuencia de nucleótidos incluida en el arnavirus.

Por consiguiente, en determinadas realizaciones, un segmento genómico de arnavirus comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo. En determinadas realizaciones, el segmento genómico está genomanipulado para transportar un ORF de arnavirus en una posición distinta de la posición natural 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;
- (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 proteína L está bajo el control de una 3' UTR de arnavirus;
- (vi) un segmento S, en donde el ORF que codifica la proteína Z está bajo el control de una 3' UTR de arnavirus;
- (vii) un segmento L, en donde el ORF que codifica la GP está bajo el control de una 5' UTR de arnavirus;
- (viii) un segmento L, en donde el ORF que codifica la NP está bajo el control de una 5' UTR de arnavirus;
- (ix) un segmento L, en donde el ORF que codifica la proteína L está bajo el control de una 5' UTR de arnavirus;
- (x) un segmento L, en donde el ORF que codifica la GP está bajo el control de una 3' UTR de arnavirus;
- (xi) un segmento L, en donde el ORF que codifica la NP está bajo el control de una 3' UTR de arnavirus; y
- (xii) un segmento L, en donde el ORF que codifica la proteína Z está bajo el control de una 3' UTR de arnavirus.

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

En ciertas realizaciones, la partícula de arnavirus comprende un segundo segmento genómico de arnavirus de manera que la partícula de arnavirus comprende un segmento S y un segmento L.

En ciertas realizaciones, una partícula de arenavirus es infecciosa, es decir, es capaz de entrar o inyectar su material genético en una célula hospedante. En ciertas realizaciones más específicas, una partícula de arenavirus es infecciosa, es decir, es capaz de entrar o inyectar su material genético en una célula hospedante seguido de amplificación y expresión de su información genética dentro de la célula hospedante. En ciertas realizaciones, la partícula de arenavirus es una partícula de arenavirus infecciosa, de replicación deficiente genomanipulada para contener un genoma con capacidad de amplificar y expresar su información genética en células infectadas pero incapaz de producir más partículas de progenie infecciosas en células que no son de complementación. En ciertas realizaciones, la partícula de arenavirus es competente para la replicación y capaz de producir más partículas de progenie infecciosas en células normales, no modificadas genéticamente. En ciertas realizaciones más específicas, dicha partícula competente para la replicación está atenuada en relación con el virus de tipo natural del que deriva la partícula competente para la replicación.

En ciertas realizaciones, un segmento genómico de arenavirus, que incluye una partícula de arenavirus que comprende el segmento genómico de arenavirus, comprende al menos un ORF de arenavirus que se ha eliminado al menos parcialmente o inactivado funcionalmente. El ORF puede codificar la GP, NP, proteína Z o proteína L de una partícula de arenavirus. Además, en ciertas realizaciones, se elimina al menos un ORF que codifica la GP, NP, proteína Z o proteína L y se reemplaza por una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo. En ciertas realizaciones, solo se elimina uno de los cuatro ORF que codifican la GP, NP, proteína Z y proteína L. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, se elimina el ORF que codifica la GP. En determinadas realizaciones, se elimina el ORF que codifica la NP. En determinadas realizaciones, se elimina el ORF que codifica la proteína Z. En determinadas realizaciones, se elimina el ORF que codifica la proteína L.

Una partícula de arenavirus bisegmentada infecciosa, de replicación deficiente descrita en el presente documento puede comprender al menos un ORF de arenavirus que se elimina al menos parcialmente o se inactiva funcionalmente. El ORF puede codificar la GP, NP, proteína Z o proteína L. Además, en ciertos casos, se puede eliminar al menos un ORF que codifica la GP, NP, proteína Z o proteína L y reemplazar por una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo. En ciertos casos, solo se puede eliminar uno de los cuatro ORF que codifican la GP, NP, proteína Z y proteína L. Por lo tanto, en ciertos casos, se puede eliminar el ORF que codifica la GP. En ciertos casos, se puede eliminar el ORF que codifica la NP. En ciertos casos, se puede eliminar el ORF que codifica la proteína Z. En ciertos casos, se puede eliminar el ORF que codifica la proteína L.

En ciertos casos, una partícula de arenavirus bisegmentada infecciosa, de replicación deficiente puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo y puede comprender además al menos una secuencia de nucleótidos que codifica al menos un péptido, polipéptido o proteína inmunomoduladores. El péptido, polipéptido o proteína inmunomoduladores puede ser la calreticulina (CRT), o un fragmento de la misma; ubiquitina o un fragmento de la misma; factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), o un fragmento del mismo; cadena invariable (CD74) o un fragmento antigénico de la misma; proteína de choque térmico 70 de *Mycobacterium tuberculosis* o un fragmento antigénico de la misma; proteína VP22 del virus del herpes simplex 1 o un fragmento antigénico de la misma; ligando de CD40 o un fragmento antigénico del mismo; o ligando de tirosina quinasa 3 relacionado con Fms (Flt3) o un fragmento antigénico del mismo.

En determinadas realizaciones, una partícula de arenavirus deriva de una especie de arenavirus específica, tal como el virus de la coriomeningitis linfocítica ("LCMV") o el virus Junin ("JUNV"). En otras palabras, la información genómica que codifica la partícula de arenavirus deriva de una especie específica de arenavirus. Por tanto, en ciertas realizaciones, la partícula de arenavirus deriva del LCMV. En otras realizaciones, la partícula de arenavirus deriva del JUNV. Además, en realizaciones específicas, el LCMV es la cepa MP, cepa WE, cepa Armstrong o cepa Armstrong Clon 13. En otras realizaciones específicas, el JUNV es la cepa Candid n.^o1 de la vacuna JUNV, o la cepa XJ Clon 3 de la vacuna JUNV.

3.2 Arenavirus trisegmentados

Las partículas de arenavirus trisegmentadas en el contexto de la invención comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo. Según la invención, la partícula de arenavirus comprende un segmento L y dos segmentos S. En determinadas realizaciones, la partícula de arenavirus trisegmentada no se recombina en una partícula de arenavirus bisegmentada competente para la replicación. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, la propagación de la partícula de arenavirus trisegmentada no da como resultado una partícula bisegmentada competente para la replicación después de 70 días de infección persistente en ratones que carecen del 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 PFU de la partícula de arenavirus trisegmentada. Las partículas de arenavirus trisegmentadas, en ciertas realizaciones, se pueden genomanipular para mejorar la estabilidad genética y asegurar una expresión transgénica duradera. Además, en ciertas realizaciones, la recombinación intersegmentaria de los dos segmentos S, uniendo dos ORF de arenavirus en solo uno en lugar de dos segmentos separados, anula la actividad del promotor viral.

En ciertas realizaciones, una partícula de arenavirus trisegmentada es infecciosa, es decir, es capaz de entrar o

inyectar su material genético en una célula hospedante. En ciertas realizaciones más específicas, una partícula de arenavirus trisegmentada es infecciosa, es decir, es capaz de entrar o inyectar su material genético en una célula hospedante seguido de amplificación y expresión de su información genética dentro de la célula hospedante. En ciertas realizaciones, la partícula de arenavirus trisegmentada es una partícula de arenavirus infecciosa, de replicación deficiente genomanipulada 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 que no son de complementación. En ciertas realizaciones, la partícula de arenavirus trisegmentada es competente para la replicación y es capaz de producir más partículas de progenie infecciosas en células normales, no modificadas genéticamente. En ciertas realizaciones más específicas, dicha partícula competente para la replicación está atenuada en relación con el virus de tipo natural del que deriva la partícula competente para la replicación.

El antígeno tumoral o antígeno asociado a tumor codificado por la secuencia de nucleótidos incluida dentro de una partícula de arenavirus trisegmentada puede ser uno o más de los antígenos tumorales o antígenos asociados a tumor seleccionados del grupo que consiste en antígenos virales oncogénicos, antígenos de cáncer de testículo, antígenos oncofetales, antígenos de diferenciación tisular, antígenos proteicos mutantes, neoantígenos, adipofilina, AIM-2, ALDH1A1, BCLX (L), BING-4, CALCA, CD45, CPSF, ciclina D1, DKK1, ENAH (hMcna), Ga733 (EpCAM), EphA3, EZH2, FGF5, glipican-3, G250 /MN/CAIX, HER-2/neu, IDO1, IGF2B3, IL13Ralpha2, carboxil esterasa intestinal, alfa-fetoproteína, calicreína 4, KIF20A, Lengsin, M-CSF, MCSP, mdm-2, Meloe, MMP-2, MMP-7, MUC1, MUC5AC, p53 (no mutante), PAX5, PBF, PRAME, PSMA, RAGE, RAGE-1, RGS5, RhoC, RNF43, RU2AS, secernina 1, SOX10, STEAP1 (antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de la próstata 1), survivina, telomerasa, VEGF, WT1, EGF-R, CEA, CD20, CD33, CD52, glicoproteína 100 (proteína GP100 o gp 100), MELANA/MART1, MART2, NY-ESO-1, p53, MAGE A1, MAGE A3, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, CDK4, alfa-actinina-4, ARTC1, BCR-ABL, 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, ETV6-AML, proteína de fusión ETV6-AML1, FLT3-ITD, FN1, GPNMB, proteína de fusión LDLR-fucosiltransferasaAS, NFYC, OGT, OS-9, proteína de fusión pml-RARalpha, PRDX5, PTPRK, H-ras, K-ras (oncogén viral del sarcoma de rata V-Ki-ras2 Kirsten), N-ras, RBAF600, SIRT2, SNRPD1, SSX, SSX2, proteína de fusión SYT-SSX1 o -SSX2, TGF-betaRII, trifosfato isomerasa, ormdm-2, LMP2, HPV E6/E7, EGFRvIII (variante del factor de crecimiento epidérmico III), Idiotipo, GD2, gangliósido G2), mutante Ras, p53 (mutante), proteinasa3 (PR1), tirosinasa, PSA, hTERT, puntos de corte de translocación de sarcoma, EphA2, fosfatasa ácida prostática PAP, neo-PAP, ML-IAP, AFP, ERG (gen de fusión TMPRSS2 ETS), NA17, PAX3, ALK, receptor de andrógenos, ciclina B1, ácido polisialico, MYCN, TRP2, TRP2-Int2, GD3, fucosil GM1, mesotelina, PSCA, sLe(a), cyp1B1, PLAC1, GM3, BORIS, Tn, GLoboh, NY-BR-1, SART3, STn, anhidrasa carbónica IX, OY-TES1, proteína espermática 17, LCK, antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMWMAA), AKAP-4, SSX2, XAGE 1, B7H3, Legumina, Tie 2, Page4, VEGFR2, MAD-CT-1, FAP, PDGFR-beta, MAD-CT-2, antígeno relacionado con For 1, TRP1, CA-125, CA19-9, calretinina, antígeno de membrana epitelial (EMA), antígeno de tumor epitelial (ETA), CD19, CD34, CD99, CD117, cromogranina, citoqueratina, desmina, proteína ácida fibrilar glial (GFAP), proteína del líquido de la enfermedad quística macroscópica (GCDFP-15), antígeno HMB-45, Myo-D1, actina específica del músculo (MSA), neurofilamento, enolasa específica de neurona (NSE), fosfatasa alcalina placentaria, sinaptofisina, tiroglobulina, factor de transcripción tiroidea 1, forma dimérica de la isoenzima piruvato quinasa tipo M2 (tumor M2-PK), BAGE BAGE-1, CAGE, CTAGE, FATE, GAGE, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, HCA661, HOM-TES-85, MAGEA, MAGEB, MAGEC, NA88, NY-SAR-35, SPANXB1, SPA17, SSX, SYCP1, TPTE, carbohidrato/gangliósido GM2 (antígeno oncofetal-inmunogénico-1 OFA-I-1), GM3, CA 15-3 (CA 27.29)BCAA), CA 195, CA 242, CA 50, CAM 43, CEA, EBNA, EF2, antígeno del virus de Epstein-Barr, HLA-A2, HLA-A11, HSP70-2, KIAA0205, MUM-1, MUM-2, MUM-3, miosina clase I, GnTV, Herv-K-mel, LAGE-1, LAGE-2, (proteína espermática) SP17, SCP-1, P15(58), Hom/Mel-40, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR, TSP-180, P185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23H1, TAG-72, TAG-72-4, CA-72-4, CAM 17.1, NuMa, 13-catenina, P16, TAGE, CT7, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, 13HCG, BCA225, BTAA, CD68\KP1, CO-029, HTgp-175, M344, MG7-Ag, MOV18, NB\70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90, TAAL6, TLP, TPS, CD22, CD27, CD30, CD70, prosteina, TARP (proteína de marco de lectura alternativo gamma del receptor de células T), Trp-p8, integrina $\alpha\beta 3$ (CD61), galactina o Ral-B, CD123, CLL-1, CD38, CS-1, CD138 y ROR1. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos codifica dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más antígenos tumorales, antígenos asociados a tumores o fragmentos antigénicos de los mismos. En ciertas realizaciones, un fragmento antigénico de un antígeno tumoral o antígeno asociado a tumor es codificado por la secuencia de nucleótidos incluida dentro del arenavirus trisegmentado.

En determinadas realizaciones, los arenavirus trisegmentados tienen reordenamientos de sus ORF en sus genomas y una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo. En una realización particular, se ha genomanipulado una partícula de arenavirus trisegmentada para llevar un ORF de arenavirus en una posición distinta de la posición natural. Así, en determinadas realizaciones particulares, un arenavirus trisegmentado comprende: una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo; y al menos un ORF de arenavirus en una posición distinta de la posición natural de dicho ORF, en donde el ORF codifica la GP, NP, proteína Z o proteína L de una partícula de arenavirus.

En ciertas realizaciones, uno de los dos segmentos S incluidos en la partícula de arenavirus trisegmentada 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 el que 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 proteína L está bajo el control de una 3' UTR de arnavirus; y
- 5 (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, la 3' UTR de partícula de arnavirus trisegmentada es la 3' UTR del segmento S de arnavirus. En otras realizaciones, la 5' UTR de partícula trisegmentada de arnavirus es la 5' UTR del segmento S de arnavirus.

- 10 En determinadas realizaciones, los dos segmentos S comprenden: (i) una o dos secuencias de nucleótidos, cada una de las cuales codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo; o (ii) uno o dos ORF de arnavirus duplicados; o (iii) una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo y un ORF de arnavirus duplicado.

- 15 En determinadas realizaciones, una partícula de arnavirus trisegmentada comprende al menos un ORF de arnavirus que se elimina al menos parcialmente o se inactiva funcionalmente. El ORF puede codificar la GP, NP, proteína Z o proteína L de una partícula de arnavirus. Además, en ciertas realizaciones, se elimina al menos un ORF que codifica la GP, NP, proteína Z o proteína L y se reemplaza por una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo. En ciertas realizaciones, solo se elimina uno de los cuatro ORF que codifican la GP, NP, proteína Z y proteína L. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, se elimina el ORF que codifica la GP. En determinadas realizaciones, se elimina el ORF que codifica la NP. En determinadas realizaciones, se elimina el ORF que codifica la proteína Z. En determinadas realizaciones, se elimina el ORF que codifica la proteína L.
- 20

- 25 En determinadas realizaciones, una partícula de arnavirus trisegmentada deriva de una especie de arnavirus específica, tal como el virus de la coriomeningitis linfocítica ("LCMV") o el virus Junín ("JUNV"). En otras palabras, la información genómica que codifica la partícula de arnavirus trisegmentada deriva de una especie específica de arnavirus. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la partícula de arnavirus trisegmentada deriva del LCMV. En otras realizaciones, la partícula de arnavirus trisegmentada deriva del JUNV. Además, en realizaciones específicas, el LCMV es la cepa MP, cepa WE, cepa Armstrong o cepa Armstrong Clon 13. En otras realizaciones específicas, el JUNV es la cepa Candid n.⁹¹ de la vacuna JUNV, o la cepa XJ Clon 3 de la vacuna JUNV.

3.3 Métodos para tratar una enfermedad neoplásica

- 30 En el presente documento se proporciona una partícula de arnavirus trisegmentada para usar en métodos de tratamiento de una enfermedad neoplásica en un sujeto. Dichos métodos pueden incluir la administración a un sujeto que lo necesite de una partícula de arnavirus trisegmentada y un inhibidor de punto de control inmunitario.

- 35 En ciertas realizaciones, la partícula de arnavirus usada en los métodos es una partícula de arnavirus infecciosa, de replicación deficiente. En ciertas realizaciones, la partícula de arnavirus usada en los métodos es una partícula de arnavirus trisegmentada, que incluye una partícula de arnavirus trisegmentada infecciosa, de replicación deficiente o una partícula de arnavirus trisegmentada competente para la replicación. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la partícula de arnavirus trisegmentada, utilizada en los métodos, es de replicación deficiente, en donde la partícula de arnavirus está genomanipulada para contener un genoma que comprende: (1) una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo; y (2) la capacidad para amplificar y expresar su información genética en células infectadas pero incapaz de producir más partículas de progenie infecciosas en células que no son de complementación. Además, en determinadas realizaciones, una partícula de arnavirus trisegmentada utilizada en los métodos es competente para la replicación, en donde la partícula de arnavirus trisegmentada está genomanipulada para contener un genoma que comprende: (1) una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo; (2) la capacidad para amplificar y expresar su información genética en células infectadas; y (3) la capacidad de producir más partículas de progenie infecciosas en células normales, no modificadas genéticamente. En ciertas realizaciones, el inhibidor de punto de control inmunitario inhibe, disminuye o interfiere con la actividad de un regulador negativo de puntos de control. Una partícula de arnavirus puede ser una partícula de arnavirus bisegmentada infecciosa, de replicación deficiente. La partícula de arnavirus infecciosa, de replicación deficiente utilizada en los métodos se transforma para contener un genoma que comprende: (1) una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo; y (2) la capacidad para amplificar y expresar su información genética en células infectadas pero incapaz de producir más partículas de progenie infecciosas en células que no son de complementación. En ciertas realizaciones, el inhibidor de punto de control inmunitario inhibe, disminuye o interfiere con la actividad de un regulador negativo de puntos de control.
- 40
- 45
- 50

- 55 En determinadas realizaciones, el antígeno tumoral o antígeno asociado a tumor codificado por la secuencia de nucleótidos incluida dentro de una partícula de arnavirus, incluida una partícula de arnavirus trisegmentada, puede

5 ser uno o más de los antígenos tumorales o antígenos asociados a tumores seleccionados del grupo que consiste en antígenos oncogénicos virales, antígenos de cáncer de testículo, antígenos oncofetales, antígenos de diferenciación tisular, antígenos proteicos mutantes, neoantígenos, adipofilina, AIM-2, ALDH1A1, BCLX (L), BING-4, CALCA, CD45, CPSF, ciclina D1, DKK1, ENAH (hMcna), Ga733 (EpCAM), EphA3, EZH2, FGF5, glicpican-3, G250 /MN/CAIX, HER-2/neu, IDO1, IGF2B3, IL13Ralpha2, carboxil esterasa intestinal, alfa-fetoproteína, calicreína 4, KIF20A, Lengsin, M-CSF, MCSP, mdm-2, Meloe, MMP-2, MMP-7, MUC1, MUC5AC, p53 (no mutante), PAX5, PBF, PRAME, PSMA, RAGE, RAGE-1, RGS5, RhoC, RNF43, RU2AS, secernina 1, SOX10, STEAP1 (antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de la próstata 1), survivina, telomerasa, VEGF, WT1, EGF-R, CEA, CD20, CD33, CD52, glicoproteína 100 (GP100 o proteína gp 100), MELANA/MART1, MART2, NY-ESO-1, p53, MAGE A1, MAGE A3, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, CDK4, alfa-actinina-4, ARTC1, BCR-ABL, 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, ETV6-AML, proteína de fusión ETV6-AML1, FLT3-ITD, FN1, GPNMB, proteína de fusión LDLR-fucosiltransferasaAS, NFYC, OGT, OS-9, proteína de fusión pml-RARalfa, PRDX5, PTPRK, H-ras, K-ras (oncogén viral del sarcoma de rata V-Ki-ras2 Kirsten), N-ras, RBAF600, SIRT2, SNRPD1, SSX, SSX2, proteína de fusión SYT-SSX1 o SSX2, TGF-betaRii, triosafosfato isomerasa, ormdm-2, LMP2, HPV E6/E7, EGFRvIII (factor de crecimiento epidérmico variante III), Idiotipo, GD2, gangliósido G2), mutante Ras, p53 (mutante), proteinasa3 (PR1), tirosinasa, PSA, hTERT, puntos de corte de translocación de sarcoma, EphA2, fosfatasa ácida prostática PAP, neo-PAP, ML-IAP, AFP, ERG (gen de fusión TMPRSS2 ETS), NA17, PAX3, ALK, receptor de andrógenos, ciclina B1, ácido polisialico, MYCN, TRP2, TRP2-Int2, GD3, fucosil GM1, mesotelina, PSCA, sle(a), cyp1B1, PLAC1, GM3, BORIS, Tn, GLoboH, NY-BR-1, SART3, STn, anhidrasa carbónica IX, OY-TES1, proteína espermática 17, LCK, antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMWMAA), AKAP-4, SSX2, XAGE 1, B7H3, Legumina, Tie 2, Page4, VEGFR2, MAD-CT-1, FAP, PDGFR-beta, MAD-CT-2, antígeno relacionado con For 1, TRP1, CA-125, CA19-9, calretinina, antígeno de membrana epitelial (EMA), antígeno tumoral epitelial (ETA), CD19, CD34, CD99, CD117, cromogranina, citoqueratina, desmina, proteína ácida fibrilar glial (GFAP), proteína del líquido de la enfermedad quística macroscópica (GCDFP-15), antígeno HMB-45, Myo-D1, actina específica del músculo (MSA), neurofilamento, enolasa específica de neurona (NSE), fosfatasa alcalina placentaria, sinaptofisina, tiroglobulina, factor de transcripción tiroidea 1, forma dimérica de la isoenzima piruvato quinasa tipo M2 (tumor M2-PK), BAGE BAGE-1, CAGE, CTAGE, FATE, GAGE, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, HCA661, HOM-TES-85, MAGEA, MAGEB, MAGEC, NA88, NY-SAR-35, SPANXB1, SPA17, SSX, SYCP1, TPTE, carbohidrato/gangliósido GM2 (antígeno oncofetal-inmunogénico-1 OFA-I-1), GM3, CA 15-3 (CA 27.29/BCAA), CA 195, CA 242, CA 50, CAM 43, CEA, EBNA, EF2, antígeno del virus de Epstein-Barr, HLA-A2, HLA-A11, HSP70-2, KIAA0205, MUM-1, MUM-2, MUM-3, miosina clase I, GnTV, Herv-K-mel, LAGE-1, LAGE-2, (proteína espermática) SP17, SCP-1, P15(58), Hom/Mel-40, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR, TSP-180, P185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23H1, TAG-72, TAG-72-4, CA-72-4, CAM 17.1, NuMa, 13-catenina, P16, TAGE, CT7, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, 13HCG, BCA225, BTAA, CD68/KP1, CO-029, HTgp-175, M344, MG7-Ag, MOV18, NB170K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90, TAAL6, TLP, TPS, CD22, CD27, CD30, CD70, proteína, TARP (proteína del marco de lectura alternativo gamma del receptor de células T), Trp-p8, integrina $\alpha\beta 3$ (CD61), galactina o Ral-B, CD123, CLL-1, CD38, CS-1, CD138 y ROR1. En ciertas realizaciones, la secuencia de nucleótidos codifica dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más antígenos tumorales, antígenos asociados a tumores o fragmentos antigénicos de los mismos. En determinadas realizaciones, un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo, es codificado por la secuencia de nucleótidos incluida en el arnavirus, incluido un arnavirus trisegmentado.

El tratamiento de una enfermedad neoplásica en un sujeto comprende además la administración de un inhibidor de punto de control inmunitario que inhibe, disminuye o interfiere con la actividad de un regulador negativo de puntos de control. En ciertas realizaciones, el regulador negativo de puntos de control se selecciona del grupo que consiste en antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), CD80, CD86, muerte celular programada 1 (PD-1), ligando de muerte celular programada 1 (PD-L1), ligando de muerte celular programada 2 (PD-L2), gen de activación de linfocitos 3 (LAG-3; también conocido como CD223), galectina-3, atenuador de linfocitos B y T (BTLA), proteína de membrana 3 de células T (TIM3), galectina-9 (GAL9), B7-H1, B7-H3, B7-H4, inmunoreceptor de células T con dominios Ig e ITIM (TIGIT/Vstm3/WUCAM/VSIG9), supresor de Ig de dominio V de células T (VISTA), proteína relacionada con el receptor del factor de necrosis tumoral inducida por glucocorticoides (GITR), mediador de entrada del virus del herpes (HVEM), OX40, CD27, CD28, CD137. CGEN-15001T, CGEN-15022, CGEN-15027, CGEN-15049, CGEN-15052 y CGEN-15092.

En ciertas realizaciones, el sujeto que se trata padece, es susceptible o está en riesgo de padecer una enfermedad neoplásica. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el sujeto padece una enfermedad neoplásica. En algunas realizaciones, el sujeto es susceptible a una enfermedad neoplásica. En algunas realizaciones, el sujeto tiene riesgo de padecer una enfermedad neoplásica. En ciertas realizaciones, la enfermedad neoplásica se selecciona del grupo que consiste en leucemia linfoblástica aguda; linfoma linfoblástico agudo; leucemia linfocítica aguda; leucemia mielógena aguda; leucemia mielóide aguda (adulto/infancia); carcinoma corticosuprarrenal; cánceres relacionados con el SIDA; linfoma relacionado con el SIDA; cáncer anal; cáncer de apéndice; astrocitomas; tumor teratoideo/rabdoideo atípico; carcinoma de células basales; cáncer de las vías biliares, extrahepático (colangiocarcinoma); cáncer de vejiga; osteosarcoma óseo/histiocitoma fibroso maligno; cáncer cerebral (adulto/infantil); tumor cerebral, astrocitoma cerebeloso (adulto/infancia); tumor cerebral, tumor cerebral astrocitoma cerebral/glioma maligno; tumor cerebral, ependimoma; tumor cerebral, meduloblastoma; tumor cerebral, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales; tumor cerebral, glioma de la vía óptica e hipotalámico; glioma del tronco encefálico; cáncer de mama; adenomas/carcinoides bronquiales; tumor bronquial; linfoma de Burkitt; cáncer de la infancia; tumor gastrointestinal

carcinoide; tumor carcinoide; carcinoma del adulto, sitio primario desconocido; carcinoma de origen primario desconocido; tumor embrionario del sistema nervioso central; linfoma del sistema nervioso central, primario; cáncer de cuello uterino; carcinoma corticosuprarrenal infantil; cánceres infantiles; astrocitoma cerebral infantil; cordoma, infancia; leucemia linfocítica crónica; leucemia mielógena crónica; leucemia mieloide crónica; trastornos mieloproliferativos crónicos; cáncer de colon; cáncer colorrectal; craneofaringioma; linfoma cutáneo de células T; tumor desmoplásico de células redondas pequeñas; enfisema; cáncer endometrial; endimoblastoma; endimoma; cáncer de esófago; el sarcoma de Ewing en la familia de tumores de Ewing; tumor extracraneal de células germinales; tumor extragonadal de células germinales; cáncer de vías biliares extrahepáticas; cáncer de vesícula biliar; cáncer gástrico (de estómago); carcinoide gástrico; tumor carcinoide gastrointestinal; tumor del estroma gastrointestinal; tumor de células germinales: tumor trofoblástico gestacional extracraneal, extragonadal u ovárico; tumor trofoblástico gestacional, sitio primario desconocido; glioma; glioma del tronco encefálico; glioma, vía óptica e hipotalámico infantil; leucemia de células pilosas; cáncer de cabeza y cuello; cáncer de corazón; cáncer hepatocelular (hígado); linfoma de Hodgkin; cáncer de hipofaringe; glioma hipotalámico y de la vía óptica; melanoma intraocular; carcinoma de células de los islotes (páncreas endocrino); sarcoma de Kaposi; cáncer de riñón (cáncer de células renales); histiocitosis de células de Langerhans; cáncer de laringe; cáncer de labio y cavidad oral; liposarcoma; cáncer de hígado (primario); cáncer de pulmón no microcítico; cáncer de pulmón microcítico; linfoma, primario del sistema nervioso central; macroglobulinemia, Waldenström; cáncer de mama masculino; histiocitoma fibroso maligno de hueso/osteosarcoma; meduloblastoma; meduloepitelioma; melanoma; melanoma, intraocular (ojo); cáncer de células de Merkel; carcinoma de piel de células de Merkel; mesotelioma; mesotelioma, maligno en adulto; cáncer de cuello escamoso metastásico con tumor primario oculto; cáncer de boca; síndrome de neoplasia endocrina múltiple; mieloma múltiple/neoplasia de células plasmáticas; micosis fungoide, síndromes mielodisplásicos; enfermedades mielodisplásicas/mieloproliferativas; leucemia mielógena, crónica; leucemia mieloide aguda del adulto; leucemia mieloide, aguda infantil; mieloma, múltiple (cáncer de la médula ósea); trastornos mieloproliferativos crónicos; cáncer de cavidad nasal y senos paranasales; carcinoma nasofaríngeo; neuroblastoma, cáncer de pulmón no microcítico; linfoma no Hodgkin; oligodendroglioma; cáncer oral; cáncer de cavidad oral; cáncer orofaríngeo; osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno de hueso; cáncer de ovario; cáncer epitelial de ovario (tumor del estroma epitelial superficial); tumor de células germinales de ovario; tumor de ovario de bajo potencial maligno; cáncer de páncreas; cáncer de páncreas, células de los islotes; papilomatosis; cáncer de seno paranasal y cavidad nasal; cáncer de paratiroides; cáncer de pene; cáncer de faringe; feocromocitoma; astrocitoma pineal; germinoma pineal; tumores del parénquima pineal de diferenciación intermedia; pineoblastoma y tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales; tumor hipofisario; adenoma hipofisario; 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); cáncer de células de transición de pelvis renal y uréter; carcinoma del tracto respiratorio que implica el gen NUT en el cromosoma 15; retinoblastoma; rhabdomyosarcoma, infancia; cáncer de glándulas salivales; sarcoma, familia de tumores de Ewing; síndrome de Sézary; cáncer de piel (melanoma); cáncer de piel (no melanoma); cáncer de pulmón microcítico; cáncer de intestino delgado sarcoma de tejidos blandos; sarcoma de tejidos blandos; tumor de la médula espinal; carcinoma de células escamosas; cáncer de cuello escamoso con primario oculto, metastásico; cáncer de estómago (gástrico); tumor neuroectodérmico primitivo supratentorial; linfoma de células T, cutáneo (micosis fungoide y síndrome de Sézary); cáncer de testículo; cáncer de garganta; timoma; timoma y carcinoma tímico; cáncer de tiroides; cáncer de tiroides, infantil; cáncer de células de transición de la pelvis renal y el uréter; cáncer de uretra; cáncer de útero, endometrio; sarcoma uterino; cáncer de vagina; cáncer de vulva; y Tumor de Wilms.

En determinadas realizaciones, un arnavirus trisegmentado y un inhibidor de punto de control inmunitario que se utilizan en el contexto de la invención se pueden administrar en una variedad de combinaciones diferentes. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la partícula de arnavirus y el inhibidor de punto de control inmunitario se administran simultáneamente. En otras realizaciones, la partícula de arnavirus se administra antes de la administración del inhibidor de punto de control inmunitario. En otras realizaciones más, la partícula de arnavirus se administra después de la administración del inhibidor de punto de control inmunitario. El intervalo entre la administración de la partícula de arnavirus y el inhibidor de punto de control inmunitario puede ser horas, días, semanas o meses. Así, en algunas realizaciones, el intervalo es de 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, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 1 semana, aproximadamente 8 días, aproximadamente 9 días, aproximadamente 10 días, aproximadamente 11 días, aproximadamente 12 días, aproximadamente 13 días, 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, aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses, aproximadamente 6 meses o más.

En determinadas realizaciones, el método incluye administrar un arnavirus trisegmentado y el inhibidor de punto de control inmunitario en una cantidad terapéuticamente eficaz. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, un método para tratar una enfermedad neoplásica en un sujeto comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una partícula de arnavirus y una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de

punto de control inmunitario, en donde la partícula de arnavirus está genomanipulada para contener un segmento genómico que comprende: una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo; y al menos un ORF de arnavirus en una posición distinta de la posición natural del ORF, en donde el ORF codifica la GP, NP, proteína Z o proteína L de la partícula de arnavirus, y en donde el inhibidor de punto de control inmunitario inhibe, disminuye o interfiere con la actividad de un regulador negativo de puntos de control.

Un método para tratar una enfermedad neoplásica en un sujeto puede comprender administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una partícula de arnavirus bisegmentada infecciosa, de replicación deficiente y una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de punto de control inmunitario, en donde la partícula de arnavirus está genomanipulada para contener un genoma que comprende: una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo; y la capacidad para amplificar y expresar su información genética en células infectadas pero incapaz de producir más partículas de progenie infecciosas en células que no son de complementación, y en donde el inhibidor de punto de control inmunitario inhibe, disminuye o interfiere con la actividad de un regulador negativo de punto de control.

En determinadas realizaciones, los métodos para tratar una enfermedad neoplásica en un sujeto comprenden administrar al sujeto dos o más arnavirus, incluido un arnavirus trisegmentado, que expresa un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo. En una realización más específica, el método incluye administrar al sujeto una primera partícula de arnavirus y administrar al sujeto, después de un periodo de tiempo, una segunda partícula de arnavirus. En otra realización más, la primera partícula de arnavirus y la segunda partícula de arnavirus derivan de diferentes especies de arnavirus y/o comprenden secuencias de nucleótidos que codifican diferentes antígenos tumorales, antígenos asociados a tumores o fragmentos antigénicos de los mismos.

De acuerdo con la invención, el método incluye administrar a un sujeto que lo necesite una partícula de arnavirus que codifica un neoantígeno en combinación con un inhibidor de punto de control inmunitario. En algunas realizaciones, el neoantígeno es una glucoquinasa dependiente de ADP (Adpgk) que tiene una mutación R203M. En algunas realizaciones, el sujeto tiene cáncer de colon. En algunas realizaciones, el inhibidor de punto de control inmunitario es un anticuerpo que se une o inhibe la actividad de muerte celular programada 1 ("PD1"). En consecuencia, en una realización, se describe en el presente documento un método para tratar el cáncer de colon en un sujeto que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una partícula de arnavirus y un inhibidor de punto de control inmunitario, en donde la partícula de arnavirus está genomanipulada para contener un segmento genómico de arnavirus que comprende: (i) una secuencia de nucleótidos que codifica un neoantígeno o un fragmento antigénico del mismo; y (ii) al menos un ORF de arnavirus en una posición distinta de la posición natural del ORF, en donde el ORF codifica la GP, la NP, la proteína Z o la proteína L de la partícula de arnavirus, en donde el neoantígeno es Adpgk que tiene una mutación R203M, el inhibidor de punto de control inmunitario es un anticuerpo que se une o inhibe PD1, la partícula de arnavirus deriva del LCMV y es una partícula de arnavirus trisegmentada que comprende un segmento L y dos segmentos S, y en donde, en uno de los dos segmentos S, el ORF que codifica la GP está bajo el control de una 3' UTR de arnavirus, y cada uno de los dos segmentos S comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el neoantígeno o fragmento antigénico del mismo.

En ciertas realizaciones, un método incluye administrar a un sujeto que lo necesite una partícula de arnavirus que codifica un antígeno de melanoma en combinación con un inhibidor de punto de control inmunitario. En algunas realizaciones, el antígeno de melanoma es la glicoproteína 100 ("GP100"), proteína relacionada con tirosinasa 1 ("TRP1") o proteína relacionada con tirosinasa 2 ("TRP2"). En algunas realizaciones, el sujeto tiene melanoma. En algunas realizaciones, el inhibidor de punto de control inmunitario es un anticuerpo que se une o inhibe la actividad de PD1. Por consiguiente, en una realización, un método para tratar el melanoma en un sujeto comprende administrar a un sujeto que lo necesite una partícula de arnavirus y un inhibidor de punto de control inmunitario, en donde la partícula de arnavirus está genomanipulada para contener un segmento genómico de arnavirus que comprende: (i) una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno de melanoma o un fragmento antigénico del mismo; y (ii) al menos un ORF de arnavirus en una posición diferente a la posición natural del ORF, en donde el ORF codifica la GP, la NP, la proteína Z o la proteína L de la partícula de arnavirus, en donde el antígeno de melanoma se selecciona del grupo que consiste en GP100, TRP1 y TRP2, el inhibidor de punto de control inmunitario es un anticuerpo que se une o inhibe PD1, la partícula de arnavirus deriva del LCMV y es una partícula de arnavirus trisegmentada que comprende un segmento L y dos segmentos S, y en donde, en uno de los dos segmentos S, el ORF que codifica la GP está bajo el control de una 3' UTR de arnavirus, y cada uno de los dos segmentos S comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el antígeno de melanoma o fragmento antigénico del mismo.

La invención se refiere al uso de una partícula de arnavirus y un inhibidor de punto de control inmunitario en un método de tratamiento de una enfermedad neoplásica en un sujeto.

3.4 Composiciones farmacéuticas y Kits

En ciertas realizaciones, se proporcionan en el presente documento composiciones, p. ej., composiciones farmacéuticas, inmunogénicas o de vacunas, que comprenden la partícula de arnavirus trisegmentada, un inhibidor de punto de control inmunitario y un vehículo farmacéuticamente aceptable como se define en el contexto de la invención. Por lo tanto, en algunas realizaciones, se proporciona en el presente documento una composición

farmacéutica que comprende la partícula de arnavirus trisegmentada, un inhibidor de punto de control inmunitario y un vehículo farmacéuticamente aceptable como se define en el contexto de la invención.

En ciertas realizaciones, la partícula de arnavirus contenida dentro de las composiciones es una partícula de arnavirus trisegmentada infecciosa, de replicación deficiente o una partícula de arnavirus trisegmentada competente para la replicación. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, las composiciones proporcionadas en el presente documento, que incluyen una composición farmacéutica, inmunogénica o de vacuna, comprenden la partícula de arnavirus trisegmentada, que es de replicación deficiente, en donde la partícula de arnavirus está genomanipulada para contener un genoma que comprende: (1) una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo; y (2) la capacidad de amplificar y expresar su información genética en células infectadas pero incapaz de producir más partículas de progenie infecciosas en células que no son de complementación. Además, en ciertas realizaciones, las composiciones proporcionadas en el presente documento, que incluyen una composición farmacéutica, inmunogénica o de vacuna, comprenden una partícula de arnavirus trisegmentada que es competente para la replicación, en donde la partícula de arnavirus trisegmentada está genomanipulada para contener un genoma que comprende: (1) una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo; (2) la capacidad de amplificar y expresar su información genética en células infectadas; y (3) la capacidad de producir más partículas de progenie infecciosas en células normales, no modificadas genéticamente. En ciertas realizaciones, el inhibidor de punto de control inmunitario inhibe, disminuye o interfiere con la actividad de un regulador negativo de puntos de control.

En el presente documento se describe una composición farmacéutica que comprende una partícula de arnavirus bisegmentada, infecciosa, de replicación deficiente, un inhibidor de punto de control inmunitario y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La partícula de arnavirus puede estar genomanipulada para contener un genoma que comprende: (1) una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo; y (2) la capacidad de amplificar y expresar su información genética en células infectadas pero incapaz de producir más partículas de progenie infecciosas en células que no son de complementación. El inhibidor de punto de control inmunitario puede inhibir, disminuir o interferir con la actividad de un regulador negativo de puntos de control.

En ciertas realizaciones, el antígeno tumoral o antígeno asociado a tumor codificado por la secuencia de nucleótidos incluida dentro de una partícula de arnavirus puede ser uno o más de los antígenos tumorales o antígenos asociados a tumor seleccionados del grupo que consiste en antígenos virales oncogénicos, antígenos de cáncer de testículo, antígenos oncofetales antígenos, antígenos de diferenciación de tejidos, antígenos de proteínas mutantes, neoantígenos, adipofilina, AIM-2, ALDH1A1, BCLX (L), BING-4, CALCA, CD45, CPSF, ciclina D1, DKK1, ENAH (hMcna), Ga733 (EpCAM), EphA3, EZH2, FGF5, glipican-3, G250 /MN/CAIX, HER-2/neu, IDO1, IGF2B3, IL13Ralpha2, carboxil esterasa intestinal, alfa-fetoproteína, caliceína 4, KIF20A, Lengsin, M-CSF, MCSP, mdm-2, Meloe, MMP-2, MMP-7, MUC1, MUC5AC, p53 (no mutante), PAX5, PBF, PRAME, PSMA, RAGE, RAGE-1, RGS5, RhoC, RNF43, RU2AS, secernina 1, SOX10, STEAP1 (antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de la próstata 1), survivina, telomerasa, VEGF, WT1, EGF-R, CEA, CD20, CD33, CD52, glicoproteína 100 (proteína GP100 o gp 100), MELANA/MART1, MART2, NY-ESO-1, p53, MAGE A1, MAGE A3, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, CDK4, alfa-actinina-4, ARTC1, BCR-ABL, 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, ETV6-AML, ETV6 - proteína de fusión AML1, FLT3-ITD, FN1, GPNMB, proteína de fusión LDLR-fucosiltransferasaAS, NFYC, OGT, OS-9, proteína de fusión pml-RARalpha, PRDX5, PTPRK, H-ras, K-ras (oncogén viral del sarcoma de rata Kirsten V-Ki-ras2), N-ras, RBAF600, SIRT2, SNRPD1, SSX, SSX2, proteína de fusión SYT-SSX1 o -SSX2, TGF-betaRII, trisafosfato isomerasa, ormdm-2, LMP2, HPV E6/E7, EGFRvIII (variante III del factor de crecimiento epidérmico), Idiotipo, GD2, gangliósido G2), mutante Ras, p53 (mutante), proteinasa 3 (PR1), tirosinasa, PSA, hTERT, puntos de corte de translocación de sarcoma, EphA2, fosfatasa ácida prostática PAP, neo-PAP, ML-IAP, AFP, ERG (gen de fusión TMPRSS2 ETS), NA17, PAX3, ALK, receptor de andrógenos, ciclina B1, ácido polisiálico, MYCN, TRP2, TRP2-Int2, GD3, Fucosil GM1, mesotelina, PSCA, sLe(a), cyp1B1, PLAC1, GM3, BORIS, Tn, GLoboH, NY-BR-1, SART3, STn, anhidrasa carbónica IX, OY-TES1, proteína espermática 17, LCK, antígeno asociado a melanoma de peso molecular alto (HMWMAA), AKAP-4, SSX2, XAGE 1, B7H3, Legumina, Tie 2, Page4, VEGFR2, MAD-CT-1, FAP, PDGFR-beta, MAD-CT-2, antígeno 1 asociado a For, TRP1, CA-125, CA19-9, calretinina, antígeno de membrana epitelial (EMA), antígeno de tumor epitelial (ETA), CD19, CD34, CD99, CD117, cromogranina, citoqueratina, desmina, proteína ácida fibrilar glial (GFAP), proteína de líquido de enfermedad quística macroscópica (GCDFP-15), antígeno HMB-45, Myo-D1, actina específica de músculo (MSA), neurofilamento, enolasa específica de neurona (NSE), fosfatasa alcalina placentaria, sinaptofisina, tiroglobulina, factor de transcripción tiroidea 1, forma dimérica de la isoenzima piruvato quinasa tipo M2 (tumor M2-PK), BAGE BAGE-1, CAGE, CTAGE, FATE, GAGE, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, HCA661, HOM-TES-85, MAGEA, MAGEB, MAGEC, NA88, NY-SAR-35, SPANXB1, SPA17, SSX, SYCP1, TPTE, carbohidrato/gangliósido GM2 (antígeno oncofetal-inmunogénico-1 OFA-I-1), GM3, CA 15-3 (CA 27.29)BCAA, CA 195, CA 242, CA 50, CAM 43, CEA, EBNA, EF2, antígeno del virus de Epstein-Barr, HLA-A2, HLA-A11, HSP70-2, KIAAO205, MUM-1, MUM-2, MUM-3, miosina clase I, GnTV, Herv-K-mel, LAGE-1, LAGE-2, (proteína espermática) SP17, SCP-1, P15(58), Hom/Mel-40, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR, TSP-180, P185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23H1, TAG-72, TAG-72-4, CA-72-4, CAM 17.1, NuMa, 13-catenina, P16, TAGE, CT7, 43-9F,5T4, 791Tgp72, 13HCG, BCA225, BTAA, CD68\KP1, CO-029, HTgp-175, M344, MG7-Ag, MOV18, NB70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90, TAAL6, TLP, TPS, CD22, CD27, CD30, CD70,

proteína, TARP (proteína del marco de lectura alternativo gamma del receptor de células T), Trp-p8, integrina $\alpha\beta 3$ (CD61), galactina o Ral-B, CD123, CLL-1, CD38, CS-1, CD138 y ROR1. En ciertas realizaciones, la secuencia de nucleótidos codifica dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más antígenos tumorales, antígenos asociados a tumores o fragmentos antigénicos de los mismos. En determinadas realizaciones, un fragmento antigénico de un antígeno tumoral o un antígeno asociado a un tumor está codificado por la secuencia de nucleótidos incluida en el arnavirus.

En ciertas realizaciones, la composición proporcionada en el presente documento, que incluye una composición farmacéutica, inmunogénica o de vacuna, incluye un inhibidor de punto de control inmunitario que inhibe, disminuye o interfiere con la actividad de un regulador negativo de puntos de control. En ciertas realizaciones, el regulador negativo de puntos de control se selecciona del grupo que consiste en antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), CD80, CD86, muerte celular programada 1 (PD-1), ligando de muerte celular programada 1 (PD-L1), ligando de muerte celular programada 2 (PD-L2), gen de activación de linfocitos 3 (LAG-3; también conocido como CD223), galectina-3, atenuador de linfocitos B y T (BTLA), proteína de membrana 3 de células T (TIM3), galectina-9 (GAL9), B7-H1, B7-H3, B7-H4, inmunorreceptor de células T con dominios de Ig e ITIM (TIGIT/Vstm3/WUCAM/VSIG9), supresor de Ig de dominio V de activación de células T (VISTA), proteína relacionada con el receptor del factor de necrosis tumoral inducida por glucocorticoides (GITR), mediador de entrada del virus del herpes (HVEM), OX40, CD27, CD28, CD 137. CGEN-15001T, CGEN-15022, CGEN-15027, CGEN-15049, CGEN-15052 y CGEN-15092.

En ciertas realizaciones, las composiciones proporcionadas en el presente documento, que incluyen una composición farmacéutica, inmunogénica o de vacuna, pueden usarse de acuerdo con la invención. Por tanto, en ciertas realizaciones, las composiciones se pueden usar para el tratamiento de una enfermedad neoplásica. En ciertas realizaciones específicas, las composiciones proporcionadas en el presente documento se pueden usar para el tratamiento de una enfermedad neoplásica seleccionada del grupo que consiste en leucemia linfoblástica aguda; linfoma linfoblástico agudo; leucemia linfocítica aguda; leucemia mielógena aguda; leucemia mieloide aguda (adulto/infancia); carcinoma corticosuprarrenal; cánceres relacionados con el SIDA; linfoma relacionado con el SIDA; cáncer anal; cáncer de apéndice; astrocitomas; tumor teratoideo/rabdoideo atípico; carcinoma de células basales; cáncer de las vías biliares, extrahepático (colangiocarcinoma); cáncer de vejiga; osteosarcoma óseo/histiocitoma fibroso maligno; cáncer cerebral (adulto/infantil); tumor cerebral, astrocitoma cerebeloso (adulto/infancia); tumor cerebral, astrocitoma cerebral/tumor cerebral glioma maligno; tumor cerebral, ependimoma; tumor cerebral, meduloblastoma; tumor cerebral, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales; tumor cerebral, glioma de la vía óptica e hipotalámico; glioma del tronco encefálico; cáncer de mama; adenomas/carcinoides bronquiales; tumor bronquial; linfoma de Burkitt; cáncer de la infancia; tumor gastrointestinal carcinoide; tumor carcinoide; carcinoma del adulto, sitio primario desconocido; carcinoma de origen primario desconocido; tumor embrionario del sistema nervioso central; linfoma del sistema nervioso central, primario; cáncer de cuello uterino; carcinoma corticosuprarrenal infantil; cánceres infantiles; astrocitoma cerebral infantil; cordoma, infancia; leucemia linfocítica crónica; leucemia mielógena crónica; leucemia mieloide crónica; trastornos mieloproliferativos crónicos; cáncer de colon; cáncer colorrectal; craneofaringioma; linfoma cutáneo de células T; tumor desmoplásico de células redondas pequeñas; enfisema; cáncer endometrial; ependimoblastoma; ependimoma; cáncer de esófago; sarcoma de Ewing en la familia de tumores de Ewing; tumor extracraneal de células germinales; tumor extragonadal de células germinales; cáncer de vías biliares extrahepáticas; cáncer de vesícula biliar; cáncer gástrico (de estómago); carcinoide gástrico; tumor carcinoide gastrointestinal; tumor del estroma gastrointestinal; tumor de células germinales: tumor trofoblástico gestacional extracraneal, extragonadal u ovárico; tumor trofoblástico gestacional, sitio primario desconocido; glioma; glioma del tronco encefálico; glioma, vía óptica e hipotalámico infantil; leucemia de células pilosas; cáncer de cabeza y cuello; cáncer de corazón; cáncer hepatocelular (hígado); linfoma de Hodgkin; cáncer de hipofaringe; glioma hipotalámico y de la vía óptica; melanoma intraocular; carcinoma de células de los islotes (páncreas endocrino); sarcoma de Kaposi; cáncer de riñón (cáncer de células renales); histiocitosis de células de Langerhans; cáncer de laringe; cáncer de labio y cavidad oral; liposarcoma; cáncer de hígado (primario); cáncer de pulmón no microcítico; cáncer de pulmón microcítico; linfoma primario del sistema nervioso central; macroglobulinemia, Waldenström; cáncer de mama masculino; histiocitoma fibroso maligno de hueso/osteosarcoma; meduloblastoma; meduloepitelioma; melanoma; melanoma, intraocular (ojo); cáncer de células de Merkel; carcinoma de piel de células de Merkel; mesotelioma; mesotelioma, adulto maligno; cáncer de cuello escamoso metastásico con tumor primario oculto; cáncer de boca; síndrome de neoplasia endocrina múltiple; mieloma múltiple/neoplasia de células plasmáticas; micosis fungoide, síndromes mielodisplásicos; enfermedades mielodisplásicas/mieloproliferativas; leucemia mielógena, crónica; leucemia mieloide aguda del adulto; leucemia mieloide aguda infantil; mieloma, múltiple (cáncer de la médula ósea); trastornos mieloproliferativos crónicos; cáncer de cavidad nasal y senos paranasales; carcinoma nasofaríngeo; neuroblastoma, cáncer de pulmón no microcítico; linfoma no Hodgkin; oligodendroglioma; cáncer oral; cáncer de cavidad oral; cáncer orofaríngeo; osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno de hueso; cáncer de ovarios; cáncer epitelial de ovario (tumor del estroma epitelial superficial); tumor de células germinales de ovario; tumor de ovario de bajo potencial maligno; cáncer de páncreas; cáncer de páncreas, células de los islotes; papilomatosis; cáncer de seno paranasal y cavidad nasal; cáncer de paratiroides; cáncer de pene; cáncer de faringe; feocromocitoma; astrocitoma pineal; germinoma pineal; tumores del parénquima pineal de diferenciación intermedia; pineoblastoma y tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales; tumor hipofisario; 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); cáncer de células de transición de pelvis renal y uréter; carcinoma del tracto respiratorio que implica el gen NUT en el cromosoma 15; retinoblastoma;

5 rhabdomyosarcoma, infancia; cáncer de glándulas salivales; sarcoma, familia de tumores de Ewing; síndrome de Sézary; cáncer de piel (melanoma); cáncer de piel (no melanoma); cáncer de pulmón microcítico; cáncer de intestino delgado sarcoma de tejidos blandos; sarcoma de tejidos blandos; tumor de la médula espinal; carcinoma de células escamosas; cáncer de cuello escamoso con primario oculto, metastásico; cáncer de estómago (gástrico); tumor neuroectodérmico primitivo supratentorial; linfoma de células T, cutáneo (micosis fungoide y síndrome de Sézary); cáncer de testículo; cáncer de garganta; timoma; timoma y carcinoma tímico; cáncer de tiroides; cáncer de tiroides infantil; cáncer de células de transición de la pelvis renal y el uréter; cáncer de uretra; cáncer de útero, endometrio; sarcoma uterino; cáncer de vagina; cáncer de vulva; y tumor de Wilms.

10 También se proporcionan en el presente documento kits que se pueden usar de acuerdo con la invención. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, el kit proporcionado en el presente documento incluye uno o más envases e instrucciones de uso, en el que uno o más envases comprenden una composición (p. ej., una composición farmacéutica, inmunogénica o de vacuna) proporcionada en el presente documento. En otras realizaciones determinadas, un kit proporcionado en el presente documento incluye recipientes que contienen cada uno de los ingredientes activos para realizar los métodos en el contexto de la invención. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, el kit proporcionado en el presente documento incluye dos o más envases e instrucciones de uso, en donde uno de los envases comprende una partícula de arnavirus, incluida una partícula de arnavirus trisegmentada, y otro envase comprende un inhibidor de punto de control inmunitario. En una realización específica, un kit proporcionado en el presente documento incluye dos o más envases e instrucciones de uso, en donde uno de los envases comprende una partícula de arnavirus trisegmentada y otro envase comprende un inhibidor de punto de control inmunitario, en donde la partícula de arnavirus está genomanipulada para contener un genoma que comprende: una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo; y la capacidad para amplificar y expresar su información genética en células infectadas pero incapaz de producir más partículas de progenie infecciosas en células que no son de complementación. Además, en ciertas realizaciones, uno de los envases comprende una partícula de arnavirus trisegmentada que está genomanipulada para contener un genoma que comprende: una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, un antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo; la capacidad para amplificar y expresar su información genética en células infectadas; y la capacidad de producir más partículas de progenie infecciosas en células normales, no modificadas genéticamente. Un kit puede incluir dos o más envases e instrucciones de uso, en donde uno de los envases comprende una partícula de arnavirus bisegmentada infecciosa, de replicación deficiente y otro envase comprende un inhibidor de punto de control inmunitario. Un kit puede incluir dos o más envases e instrucciones de uso, en donde uno de los envases comprende una partícula de arnavirus bisegmentada, infecciosa, de replicación deficiente y otro envase comprende un inhibidor de punto de control inmunitario, en donde la partícula de arnavirus está genomanipulada para contener un genoma que comprende: una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo; y la capacidad de amplificar y expresar su información genética en células infectadas pero incapaz de producir más partículas de progenie infecciosas en células que no son de complementación. En ciertas realizaciones, el inhibidor de punto de control inmunitario inhibe, disminuye o interfiere con la actividad de un regulador negativo de puntos de control.

3.5 Convenciones y abreviaturas

Abreviatura	Convención
APC	Célula presentadora de antígeno
célula C	Línea celular de complementación
CD4	Grupo de diferenciación 4
CD8	Grupo de diferenciación 8
CMI	Inmunidad mediada por células
GP	Glicoproteína
plásmido GS	Plásmido que expresa segmentos del genoma
IGR	Región intergénica
JUNV	Virus Junín
proteína L	ARN polimerasa dependiente de ARN
segmento L	Segmento largo
LCMV	Virus de la coriomeningitis linfocítica
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
NP	Nucleoproteína
ORF	Marco de lectura abierto
segmento S	Segmento corto

TF-plásmido	Plásmido que expresa factores de transacción
UTR	Región no traducida
proteína Z	Proteína de matriz Z

4. Breve descripción de las figuras

Fig. 1: Representación esquemática de la organización genómica del LCMV bisegmentado y trisegmentado. El genoma bisegmentado del LCMV de tipo natural consiste en un segmento S que codifica la GP y la NP y un segmento L que codifica la proteína Z y la proteína L (i). Ambos segmentos están flanqueados por las respectivas 5' y 3' UTR. El genoma del LCMV trisegmentado recombinante (r3LCMV) consiste en un segmento L y dos S con una posición donde insertar un gen de interés (aquí GFP, que alternativamente puede ser un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo, como se describe en el presente documento) en cada uno de los segmentos S. r3LCMV-GFP^{natural} (nat) tiene todos los genes virales en su posición natural (ii), mientras que el ORF de GP en r3LCMV-GFP^{artificial} (art) se yuxtapone artificialmente y se expresa bajo el control de la 3' UTR (iii).

Fig. 2: El genoma de los arenavirus de tipo natural consiste en un segmento de ARN corto (1; ~3,4 kb) y uno grande (2; ~7,2 kb). El segmento corto lleva marcos de lectura abiertos que codifican la nucleoproteína (3) y la glicoproteína (4). El segmento grande codifica la ARN polimerasa L dependiente de ARN (5) y la proteína de matriz Z (6). Los arenavirus de tipo natural pueden convertirse en vectores de vacunas deficientes en la replicación eliminando el gen de la glicoproteína e insertando, en lugar del gen de la glicoproteína, un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo descrito en el presente documento (7) contra el cual se inducirán las respuestas inmunitarias.

Las Figs. 3A-3B representan resultados ilustrativos de un modelo de cáncer de ratón MC-38 OVA (ratones C57BL/6, a los que se han implantado células tumorales MC-38 OVADim) tratado con un vector de arenavirus trisegmentado competente para la replicación que codifica un antígeno OVA (r3LCMV-OVA) y un anticuerpo anti-PD1 (aPD1) sobre el crecimiento tumoral (Fig. 3A) y porcentaje de supervivencia (Fig. 3B). Los símbolos representan la media \pm EEM de cinco (no tratados) o seis (otros grupos) ratones por grupo.

Las Figs. 4A-4C representan resultados ilustrativos de un modelo de cáncer de ratón MC-38 (ratones C57BL/6, a los que se han implantado células tumorales MC-38) tratado con un vector de arenavirus trisegmentado competente para la replicación (r3LCMV) o bisegmentado de replicación deficiente (r2LCMV) que codifica un antígeno Adpgk^{mut} (Adpgk^{mut}), y un anticuerpo anti-PD1 (α -PD-1 o PD1) en la inducción de células T citotóxicas CD8+ específicas del antígeno Adpgk^{mut} (Fig. 4A), el crecimiento tumoral (Fig. 4B) y el porcentaje de supervivencia (Fig. 4C).

La Fig. 5A representa gráficamente un régimen de tratamiento ilustrativo de un modelo de ratón con melanoma.

Las Figs. 5B-5D representan resultados ilustrativos de un modelo de ratón de melanoma (ratones C57BL/6 a los que se han inyectado células de melanoma B16F10) tratado con vectores de arenavirus trisegmentados competentes para la replicación (r3LCMV) o bisegmentados de replicación deficiente (rLCMV) que codifican antígenos de melanoma, y un anticuerpo anti-PD1 (α -PD-1) utilizando el régimen de tratamiento de la Fig. 5A, en el crecimiento tumoral (Fig. 5B), porcentaje de supervivencia animal (Fig. 5C) y días de supervivencia (Fig. 5D). Gr.1 indica grupo tratado con r3LCMV y α -PD-1. Gr.2 indica grupo tratado con rLCMV y α -PD-1. Gr.3 indica grupo tratado con tampón y α -PD-1. Gr.4 indica grupo tratado con r3LCMV solamente. Gr.5 indica grupo tratado con rLCMV solamente. Gr.6 indica tratado solo con tampón. Los símbolos representan la media \pm EEM de cinco ratones por grupo.

La invención proporciona una partícula de arenavirus para usar en un método para tratar una enfermedad neoplásica en un sujeto, en donde el método comprende administrar al sujeto la partícula de arenavirus y un inhibidor de punto de control inmunitario, en donde la partícula de arenavirus es una partícula de arenavirus trisegmentada que comprende un segmento L y dos segmentos S, y en donde la partícula de arenavirus está genomanipulada para contener un segmento genómico de arenavirus que comprende:

(i) una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo; y

(ii) al menos un marco de lectura abierto ("ORF") de arenavirus en una posición distinta de la posición de tipo natural del ORF, en donde el ORF codifica la glicoproteína ("GP"), la nucleoproteína ("NP"), la proteína de matriz Z ("proteína Z") o la ARN polimerasa L dependiente de ARN ("proteína L") de la partícula de arenavirus.

La invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una partícula de arenavirus, un inhibidor de punto de control inmunitario y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde la partícula de arenavirus es una partícula de arenavirus trisegmentada como se define en el presente documento en el contexto de su uso para tratar una enfermedad neoplásica según la invención.

La invención proporciona un kit que comprende uno o más envases e instrucciones de uso, en donde uno o más envases comprenden la composición farmacéutica de la invención.

La invención proporciona un kit que comprende dos o más envases e instrucciones de uso, en donde uno de los

envases comprende una partícula de arnavirus y otro de los envases comprende un inhibidor de punto de control inmunitario, en donde la partícula de arnavirus es una partícula de arnavirus trisegmentada como se define en el presente documento en el contexto de su uso para tratar una enfermedad neoplásica según la invención.

5 La invención proporciona una composición farmacéutica de la invención, o un kit de la invención, para usar en un método para tratar una enfermedad neoplásica en un sujeto.

5. Descripción detallada de la invención

10 La invención se refiere en general a inmunoterapias para el tratamiento de una enfermedad neoplásica, tal como el cáncer. El término "neoplásico" o "neoplasia" se refiere a un nuevo crecimiento anormal de células o tejido. Este nuevo crecimiento anormal puede formar una masa, también conocida como tumor o neoplasia. Una neoplasia incluye una neoplasia benigna, una neoplasia in situ, una neoplasia maligna y una neoplasia de comportamiento incierto o desconocido. En determinadas realizaciones, la enfermedad neoplásica tratada en el contexto de la invención es el cáncer.

15 Las inmunoterapias incluyen varios métodos y composiciones. En el presente documento se proporcionan partículas de arnavirus o vectores virales para usar de acuerdo con la invención que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo. Estos virus genéticamente modificados se pueden administrar a un sujeto para el tratamiento de una enfermedad neoplásica, tal como el cáncer. En las secciones 5.1, 5.2, 5.3 y 5.4 se pueden encontrar descripciones detalladas de los arnavirus, incluidas las secuencias de nucleótidos que codifican un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo. Además, los métodos para la generación de partículas de arnavirus o vectores virales para usar según la invención y las composiciones proporcionadas en el presente documento se describen con más detalle en las secciones 5.5 y 5.6.

20 De acuerdo con la invención, además de administrar partículas de arnavirus o vectores virales a un sujeto, las inmunoterapias para tratar una enfermedad neoplásica incluyen un modulador de punto de control inmunitario. La expresión "modulador de punto de control inmunitario" (también denominado "modulador de punto de control" o "regulador de punto de control") se refiere a una molécula o a un compuesto que modula (p. ej., reduce total o parcialmente, inhibe, interfiere, activa, estimula, aumenta, refuerza o apoya) la función de una o más moléculas de punto de control. Por lo tanto, un modulador de punto de control inmunitario puede ser un inhibidor de punto de control inmunitario o un activador de punto de control inmunitario.

25 Un "inhibidor de punto de control inmunitario" se refiere a una molécula que inhibe, disminuye o interfiere con la actividad de un regulador negativo de punto de control. En ciertas realizaciones, los inhibidores de puntos de control inmunitarios para usar de acuerdo con la invención y con las composiciones proporcionadas en el presente documento pueden inhibir la actividad de un regulador negativo de punto de control directamente, o disminuir la expresión de un regulador negativo de punto de control, o interferir con la interacción de un regulador negativo de punto de control y una pareja de unión (p. ej., un ligando). Los inhibidores de puntos de control inmunitarios para usar de acuerdo con la invención y con las composiciones proporcionadas en el presente documento incluyen una proteína, un polipéptido, un péptido, un oligonucleótido antiparalelo, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o una molécula de ARN inhibidora que se dirige a la expresión de un regulador negativo de punto de control.

30 Un "regulador negativo de punto de control" se refiere a una molécula que regula por disminución las respuestas inmunitarias (p. ej., la activación de células T) mediante el suministro de una señal negativa a las células T después de su acoplamiento con ligandos o contrarreceptores. Las funciones ejemplares de un regulador negativo de punto de control son prevenir la activación inmunitaria desproporcionada, minimizar el daño colateral y/o mantener la autotolerancia periférica. En ciertas realizaciones, un regulador negativo de punto de control es un ligando o receptor expresado por una célula presentadora de antígeno. En ciertas realizaciones, un regulador negativo de punto de control es un ligando o receptor expresado por una célula T. En ciertas realizaciones, un regulador negativo de punto de control es un ligando o receptor expresado tanto por una célula presentadora de antígeno como por una célula T.

35 Por lo tanto, en ciertas realizaciones, los métodos y composiciones descritos para tratar una enfermedad neoplásica usan una partícula de arnavirus o un vector viral que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo y un inhibidor de punto de control inmunitario. Tal inhibidor de punto de control inmunitario puede inhibir, disminuir o interferir con la actividad de un regulador negativo de punto de control. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, los métodos para tratar una enfermedad neoplásica usan una partícula de arnavirus o un vector viral que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo, y un inhibidor de punto de control inmunitario que inhibe, disminuye o interfiere con la actividad de un regulador de punto de control negativo. Además, en determinadas realizaciones, en el presente documento se proporcionan composiciones que comprenden una partícula de arnavirus o vector viral que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo, y un inhibidor de punto de control inmunitario que inhibe, disminuye o interfiere con la actividad de un regulador de punto de control negativo. En ciertas realizaciones, la partícula de arnavirus o vector viral está genomanipulado para contener un segmento genómico de arnavirus que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un

fragmento antigénico del mismo y al menos un marco de lectura abierto ("ORF") de arenavirus en una posición distinta de la posición de tipo natural del ORF. En determinadas realizaciones, la partícula de arenavirus para su uso según la invención es una partícula de arenavirus trisegmentada o un vector viral, que puede ser de replicación deficiente o competente para la replicación. En otras realizaciones más, la partícula de arenavirus o vector viral trisegmentado, cuando se propaga, no da como resultado una partícula viral bisegmentada competente para la replicación. Los métodos y composiciones para usar una partícula de arenavirus o vector viral y un inhibidor de punto de control inmunitario descritos se describen con más detalle en las secciones 5.8 y 5.9.

5.1 Arenavirus con un marco de lectura abierto en una posición no natural

Los arenavirus en el contexto de la invención tienen reordenamientos de sus ORF y una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo. En ciertas realizaciones, tales arenavirus son infecciosos y competentes para la replicación. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, un segmento genómico de arenavirus está genomanipulado para llevar un ORF de arenavirus en una posición no natural, es decir, una posición distinta de la posición en la que se encuentra el gen respectivo en virus aislados de la naturaleza, tal como LCMV-MP (denominada en el presente documento "posición natural") y una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo.

Los segmentos genómicos de arenavirus de tipo natural y los ORF se conocen en la técnica. En particular, el genoma de arenavirus consiste en un segmento S y un segmento L. El segmento S lleva 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 5' y 3' UTR.

En ciertas realizaciones, un segmento genómico de arenavirus se puede genomanipular para llevar dos o más ORF de arenavirus en una posición distinta a la posición natural. En otras realizaciones, el segmento genómico de arenavirus se puede genomanipular para llevar dos ORF de arenavirus, o tres ORF de arenavirus, o cuatro ORF de arenavirus en una posición distinta a la posición natural.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(x) un segmento L de arenavirus, en donde el ORF que codifica la GP está bajo el control de una 3' UTR de arenavirus;

(xi) un segmento L de arenavirus, en donde el ORF que codifica la NP está bajo el control de una 3' UTR de arenavirus; y

(xii) un segmento L de arenavirus, en donde el ORF que codifica la proteína Z está bajo el control de una 3' UTR de arenavirus.

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

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

En ciertas realizaciones, el ORF que está en la posición no natural del segmento genómico de arenavirus puede estar

5 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 de la 5' UTR del segmento S o del segmento L. En otra realización específica, el elemento promotor de la 3' UTR es el elemento promotor de la 3' UTR del segmento S o del segmento L.

10 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., Perez 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 el segmento L del arnavirus. En realizaciones más específicas, la 5' UTR truncada es la 5' UTR del segmento S o el segmento L del arnavirus.

15 En el contexto de la invención, una partícula de arnavirus comprende un primer segmento genómico que se ha genomaniplado para llevar un ORF en una posición diferente de la posición natural del ORF y un segundo segmento genómico de arnavirus de manera que la partícula de arnavirus comprende un segmento S y un segmento L. En realizaciones específicas, el ORF en una posición distinta de la posición natural del ORF es uno de los ORF de arnavirus.

20 En ciertas realizaciones específicas, la partícula de arnavirus puede comprender un complemento completo de los cuatro ORF de arnavirus. En realizaciones específicas, el segundo segmento genómico de arnavirus se ha genomaniplado para llevar un ORF en una posición distinta de la posición natural del ORF. En otra realización específica, el segundo segmento genómico de arnavirus puede ser el segmento genómico de tipo natural (es decir, comprende los ORF en el segmento en las posiciones naturales).

En ciertas realizaciones, el primer segmento genómico de arnavirus es un segmento L y el segundo segmento genómico de arnavirus es un segmento S. En otras realizaciones, el primer segmento genómico de arnavirus es un segmento S y el segundo segmento genómico de arnavirus es un segmento L.

25 En la tabla 1 se ilustran ejemplos no limitantes de la partícula de arnavirus que comprende un segmento genómico con un ORF en una posición diferente de la posición natural del ORF y un segundo segmento genómico.

Tabla 1

Partícula de arnavirus

30 *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 L de arnavirus; La posición 4 está bajo el control de una 3' UTR del segmento L de arnavirus.

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
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 En el contexto de la invención, se modifica por ingeniería genética un ADNc del segmento genómico de arnavirus para llevar un ORF en una posición distinta a la posición natural del ORF y una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo. En realizaciones más específicas, un ADNc o un conjunto de ADNc de un genoma de arnavirus es como se expone en la tabla 1.

10 En ciertas realizaciones, un ADNc del segmento genómico de arnavirus que está genomanipulado para llevar un ORF en una posición diferente de la posición natural del ORF es parte de o se incorpora en un vector de expresión de ADN. En una realización específica, un ADNc del segmento genómico de arnavirus que está genomanipulado para llevar un ORF en una posición distinta a la posición natural del ORF es parte de o se incorpora en un vector de expresión de ADN que facilita la producción de un segmento genómico de arnavirus. En otra realización, se puede incorporar un ADNc en un plásmido. Se proporciona una descripción más detallada de los ADNc o ácidos nucleicos y los sistemas de expresión en la Sección 5.7. Las técnicas para la producción de un ADNc son técnicas rutinarias y convencionales de biología molecular y manipulación y producción de ADN. Puede usarse 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*, 3.^a edición, Cold Spring Harbor Laboratory N.Y. (2001)).

20 En determinadas realizaciones, el ADNc del segmento genómico de arnavirus que está genomanipulado para llevar un ORF en una posición distinta de la posición natural del ORF y una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo, se introduce (p. ej., transfecta) en una célula hospedante. Por lo tanto, en algunas realizaciones, una célula hospedante comprende un ADNc del segmento genómico de arnavirus que está genomanipulado para llevar un ORF en una posición distinta de la posición natural del ORF (es decir, un ADNc del segmento genómico) y una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo. En otras realizaciones, el ADNc es parte de o se puede incorporar en un vector de expresión de ADN e introducir en una célula hospedante. Por lo tanto, en algunas realizaciones, una célula hospedante comprende un ADNc que está incorporado en un vector. En otras realizaciones, el segmento genómico de arnavirus se introduce en una célula hospedante.

30 En el presente documento se describe un método para producir el segmento genómico de arnavirus que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo, 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 *in vivo*.

35 En determinadas realizaciones, la transcripción del segmento genómico de arnavirus se realiza utilizando 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 uno de polimerasa II que se 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 los promotores de pol-I y pol-II lee desde lados opuestos hacia el segmento L y el segmento S.

40 En otras realizaciones, la transcripción del ADNc del segmento genómico de arnavirus 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 de T7, un promotor de SP6 o un promotor de T3.

45 En determinadas realizaciones, el método para producir el segmento genómico de arnavirus puede comprender además introducir en una célula hospedante el ADNc del segmento genómico de arnavirus que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo. En determinadas realizaciones, el método para producir el segmento genómico de arnavirus puede comprender además introducir en una célula hospedante el ADNc del segmento genómico de arnavirus que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo, en donde la célula hospedante expresa todos otros componentes para la producción del segmento genómico de arnavirus; y purificar el segmento genómico de arnavirus del líquido sobrenadante de la célula hospedante. Dichos métodos son bien conocidos por los expertos en la técnica.

50 En el presente documento se describen líneas celulares, cultivos y métodos de cultivo de células infectadas con ácidos nucleicos, vectores y composiciones proporcionadas en el presente documento. En la sección 5.7 se proporciona una descripción más detallada de los ácidos nucleicos, sistemas de vectores y líneas celulares descritos en el presente documento.

En determinadas realizaciones, la partícula de arnavirus da como resultado una partícula de arnavirus infecciosa y competente para la replicación. En realizaciones específicas, la partícula de arnavirus está atenuada. En una realización particular, la partícula de arnavirus está atenuada de tal manera que el virus permanece, al menos parcialmente, capaz de propagarse y replicarse *in vivo*, pero solo puede generar cargas virales bajas que dan como resultado niveles subclínicos de infección que no son patógenos. Dichos virus atenuados pueden usarse como una composición inmunogénica. En el presente documento se proporcionan composiciones inmunogénicas que comprenden un arnavirus con un ORF en una posición no natural como se describe en la sección 5.9.

5.1.1 Partícula de arnavirus de replicación deficiente con un marco de lectura abierto en una posición no natural

En determinadas realizaciones, en el presente documento se proporciona una partícula de arnavirus trisegmentada para su uso según la invención en la que (i) un ORF está en una posición distinta de la posición natural del ORF; y (ii) un ORF que codifica la GP, NP, proteína Z y proteína L se ha eliminado o inactivado funcionalmente de manera que el virus resultante no puede producir más partículas de virus de progenie infecciosas. Una partícula de arnavirus que comprende un genoma modificado genéticamente en el que uno o más ORF se han eliminado o inactivado funcionalmente se puede producir en células de complementación (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 hospedante a la célula hospedante, en donde el material genético puede expresarse y amplificarse. Además, el genoma de la partícula de arnavirus modificada genéticamente puede codificar un ORF heterólogo de un organismo distinto a una partícula de arnavirus.

En ciertas realizaciones, un ORF del arnavirus se elimina o inactiva funcionalmente y se reemplaza por una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral o antígeno asociado a tumor. En una realización específica, el ORF que codifica la glicoproteína GP del arnavirus se elimina o inactiva funcionalmente. En ciertas realizaciones, la inactivación funcional de un gen elimina cualquier producto de traducción. En ciertas realizaciones, la inactivación funcional se refiere a una alteración genética que permite algo de traducción, sin embargo, el producto de la traducción ya no es funcional y no puede reemplazar a la proteína de tipo natural.

En ciertas realizaciones, al menos uno de los cuatro ORF que codifican la GP, NP, proteína Z y proteína L se elimina y se reemplaza por una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo. En otra realización, al menos un ORF, al menos dos ORF, al menos tres ORF o al menos cuatro ORF que codifican la GP, NP, proteína Z y proteína L se pueden eliminar y reemplazar por una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo. En realizaciones específicas, solo uno de los cuatro ORF que codifican la GP, NP, proteína Z y proteína L se elimina y se reemplaza por una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo. En realizaciones más específicas, se elimina el ORF que codifica la GP del segmento genómico de arnavirus. En otra realización específica, se elimina el ORF que codifica la NP del segmento genómico de arnavirus. En realizaciones más específicas, se elimina el ORF que codifica la proteína Z del segmento genómico de arnavirus. En otra realización específica más, se elimina el ORF que codifica la proteína L.

Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la partícula de arnavirus comprende un segmento genómico que (i) está genomanipulado para llevar un ORF en una posición no natural; (ii) se elimina un ORF que codifica la GP, NP, proteína Z o proteína L; (iii) el ORF que se elimina se reemplaza por una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo.

En determinadas realizaciones, el fragmento del antígeno tumoral o antígeno asociado al tumor es antigénico cuando es capaz de (i) provocar una respuesta inmunitaria de anticuerpos en un hospedante (p. ej., ratón, conejo, cabra, burro o ser humano) en donde los anticuerpos resultantes se unen específicamente a una proteína inmunogénica expresada en o sobre una célula neoplásica (p. ej., una célula cancerosa); y/o (ii) provocar una respuesta inmunitaria de células T específica.

En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos que codifica un fragmento antigénico tiene de 8 a 100 nucleótidos de longitud, de 15 a 100 nucleótidos de longitud, de 25 a 100 nucleótidos de longitud, de 50 a 200 nucleótidos de longitud, de 50 a 400 nucleótidos de longitud, de 200 a 500 de nucleótidos de longitud, o de 400 a 600 nucleótidos de longitud, de 500 a 800 nucleótidos de longitud. En otras realizaciones, la secuencia de nucleótidos que codifica un fragmento antigénico tiene de 750 a 900 nucleótidos de longitud, de 800 a 100 nucleótidos de longitud, de 850 a 1000 nucleótidos de longitud, de 900 a 1200 nucleótidos de longitud, de 1000 a 1200 nucleótidos de longitud, de 1000 a 1500 nucleótidos de longitud o 10 a 1500 nucleótidos de longitud, de 1500 a 2000 nucleótidos de longitud, de 1700 a 2000 nucleótidos de longitud, de 2000 a 2300 nucleótidos de longitud, de 2200 a 2500 nucleótidos de longitud, de 2500 a 3000 nucleótidos de longitud, de 3000 a 3200 nucleótidos de longitud, de 3000 a 3500 nucleótidos de longitud, de 3200 a 3600 nucleótidos de longitud, de 3300 a 3800 nucleótidos de longitud, de 4000 a 4400 nucleótidos de longitud, de 4200 a 4700 nucleótidos de longitud, de 4800 a 5000 nucleótidos de longitud, de 5000 a 5200 nucleótidos de longitud, de 5200 a 5500 nucleótidos de longitud, de 5500 a 5800 nucleótidos de longitud, de 5800 a 6000 nucleótidos de longitud, de 6000 a 6400 nucleótidos de longitud, de 6200 a 6800 nucleótidos de longitud, de 6600 a 7000 nucleótidos de longitud, de 7000 a 7200 nucleótidos de longitud, de 7200 a 7500 nucleótidos de longitud, o 7500 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos codifica un péptido o polipéptido que tiene de 5 a 10 aminoácidos de longitud, de 10 a 25 aminoácidos de longitud, 25 a 50 aminoácidos de longitud,

de 50 a 100 aminoácidos de longitud, de 100 a 150 aminoácidos ácidos de longitud de longitud, de 150 a 200 aminoácidos de longitud, de 200 a 250 aminoácidos de longitud, de 250 a 300 aminoácidos de longitud, de 300 a 400 aminoácidos de longitud, de 400 a 500 aminoácidos de longitud, de 500 a 750 aminoácidos de longitud, de 750 a 1000 aminoácidos de longitud, de 1000 a 1250 aminoácidos de longitud, de 1250 a 1500 aminoácidos de longitud, de 1500 a 1750 aminoácidos de longitud, de 1750 a 2000 aminoácidos de longitud, de 2000 a 2500 aminoácidos de longitud, o más de 2500 o más aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido que no supera los 2500 aminoácidos de longitud. En realizaciones específicas, la secuencia de nucleótidos no contiene un codón de terminación. En ciertas realizaciones, la secuencia de nucleótidos es de codones optimizados. En determinadas realizaciones, se puede optimizar la composición de nucleótidos, la composición de pares de nucleótidos o ambas. Las técnicas para dichas optimizaciones se conocen en la técnica y se pueden aplicar para optimizar una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo.

En determinadas realizaciones, el crecimiento y la infectividad de la partícula de arnavirus no están afectados por la secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo.

Se pueden utilizar técnicas conocidas por los expertos en la técnica para producir una partícula de arnavirus que comprende un segmento genómico de arnavirus genomanipulado para llevar un ORF de arnavirus en una posición distinta de la posición natural y una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo. Por ejemplo, pueden usarse técnicas de genética inversa para generar dicha partícula de arnavirus. En otras realizaciones, la partícula de arnavirus de replicación deficiente (es decir, el segmento genómico de arnavirus genomanipulado para llevar un ORF de arnavirus en una posición distinta de la posición natural, en donde se ha eliminado un ORF que codifica la GP, NP, proteína Z, proteína L) puede producirse en una célula de complementación.

En determinadas realizaciones, una partícula de arnavirus o un segmento genómico de arnavirus que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo comprende además al menos una secuencia de nucleótidos que codifica al menos un péptido, polipéptido o proteína inmunomoduladores. En ciertas realizaciones, el péptido, polipéptido o proteína inmunomoduladores es la calreticulina (CRT) o un fragmento de la misma; ubiquitina o un fragmento de la misma; factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), o un fragmento del mismo; cadena invariable (CD74) o un fragmento antigénico de la misma; proteína de choque térmico 70 de *Mycobacterium tuberculosis* o un fragmento antigénico de la misma; proteína VP22 del virus del herpes simplex 1 o un fragmento antigénico de la misma; ligando de CD40 o un fragmento antigénico del mismo; o ligando de tirosina quinasa 3 relacionado con Fms (Flt3) o un fragmento antigénico del mismo.

En determinadas realizaciones, el segmento genómico de arnavirus o la partícula de arnavirus utilizada según la presente invención pueden ser virus del Viejo Mundo, por ejemplo, virus Lassa, virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), virus Mobala, virus Mopeia o virus lppy, o virus del Nuevo Mundo, por ejemplo virus Amapari, virus Flexal, virus Guanarito, virus Junín, virus Latino, virus Machupo, virus Oliveros, virus Paraná, virus Pichinde, virus Pirital, virus Sabiá, virus Tacaribe, virus Tamiami, virus Cañón del Oso o virus Arroyo Agua Blanca.

En ciertas realizaciones, la partícula de arnavirus es adecuada para usar como una vacuna y en métodos de vacunación y tratamiento de una enfermedad neoplásica, por ejemplo, el cáncer. En la sección 5.8 se proporciona una descripción más detallada de los métodos de uso de la partícula de arnavirus.

En ciertas realizaciones, la partícula de arnavirus es adecuada para su uso como una composición farmacéutica y en métodos de vacunación y tratamiento de una enfermedad neoplásica, por ejemplo, el cáncer. En la sección 5.9 se proporciona una descripción más detallada de los métodos de uso de la partícula de arnavirus.

5.2 Partícula de arnavirus trisegmentada

Las partículas de arnavirus trisegmentadas en el contexto de la invención tienen reordenamientos de sus ORF y una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo. En el contexto de la invención, una partícula de arnavirus trisegmentada comprende un segmento L y dos segmentos 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) no pueden recombinarse de forma que produzcan un solo segmento viral que podría reemplazar a los dos segmentos originales. En realizaciones específicas, la partícula de arnavirus trisegmentada comprende un ORF en una posición diferente de la posición natural del ORF y una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo. 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 e infecciosa. En otras realizaciones, la partícula de arnavirus trisegmentada carece de uno de los cuatro ORF de arnavirus. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la partícula de arnavirus trisegmentada es infecciosa pero incapaz de producir más progenie infecciosa en células que no son de complementación.

En determinadas realizaciones, el ORF que codifica la GP, NP, proteína Z o proteína L de la partícula de arnavirus trisegmentada descrita en el presente documento 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(s) S de arnavirus. En otra realización específica, la 3' UTR de arnavirus trisegmentado es la 3' UTR de un segmento(s) L de arnavirus trisegmentado. En realizaciones más específicas, la 5' UTR de arnavirus trisegmentado es la 5' UTR de uno segmento(s) S de arnavirus. En otras realizaciones específicas, la 5' UTR es la 5' UTR del(de los) segmento(s) L.

En otras realizaciones, el ORF que codifica la GP, NP, proteína Z o la proteína L de la partícula de arnavirus trisegmentada puede estar bajo el control del elemento de secuencia terminal conservada 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).

En ciertas realizaciones, el ORF que codifica la GP, NP, proteína Z o la proteína L de la partícula de arnavirus 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 la GP, NP proteína Z, proteína L de la partícula de arnavirus 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 de la 5' UTR del(los) segmento(s) S o el(los) segmento(s) L. En otra realización específica, el elemento promotor de la 3' UTR es el elemento promotor de la 3' UTR del(los) segmento(s) S o del(los) segmento(s) L.

En determinadas realizaciones, el ORF que codifica la GP, NP, proteína Z o la proteína L de la partícula de arnavirus trisegmentada 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(los) segmento(s) S o segmento(s) L de arnavirus.

En el contexto de la invención, el ADNc de la partícula de arnavirus trisegmentada comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo. En realizaciones más específicas, la secuencia de nucleótidos de ADN o el conjunto de secuencias de nucleótidos de ADN que codifican una partícula de arnavirus trisegmentada es como se expone en la tabla 2 o tabla 3.

Los ácidos nucleicos que codifican el genoma de arnavirus trisegmentado pueden ser parte o se pueden incorporar en uno o más vectores de expresión de ADN. Los ácidos nucleicos que codifican el genoma de la partícula de arnavirus trisegmentada pueden ser parte o se pueden incorporar en uno o más vectores de expresión de ADN que facilitan la producción de una partícula de arnavirus trisegmentada. Un ADNc se puede incorporar en un plásmido. En la sección 5.7 se proporciona una descripción más detallada de los ADNc y los sistemas de expresión. Las técnicas para la producción de un ADNc son técnicas rutinarias y convencionales de biología molecular y manipulación y producción de ADN. Puede usarse 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*, 3.^a edición, Cold Spring Harbor Laboratory N.Y. (2001).

El ADNc del arnavirus trisegmentado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo se puede introducir (p. ej., transfectar) en una célula hospedante. Por lo tanto, una célula hospedante puede comprender un ADNc de la partícula de arnavirus trisegmentada (es decir, un ADNc de los segmentos genómicos de la partícula de arnavirus trisegmentada) y una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo. El ADNc puede ser parte de o se puede incorporar en un vector de expresión de ADN e introducir en una célula hospedante. Por lo tanto, una célula hospedante puede comprender un ADNc que se incorpora en un vector. Los segmentos genómicos de arnavirus trisegmentado (es decir, el segmento L y segmentos S) pueden introducirse en una célula hospedante.

En el presente documento se describe un método para producir la partícula de arnavirus trisegmentada, en donde el método comprende transcribir el ADNc de la partícula de arnavirus trisegmentada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo. En ciertos casos, puede estar presente una proteína polimerasa viral durante la transcripción de la partícula de arnavirus trisegmentada *in vitro* o *in vivo*. En determinados casos, la transcripción del segmento genómico de arnavirus se realiza usando un promotor bidireccional.

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

En otros casos, la transcripción del ADNc del segmento genómico de arnavirus 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 de T7, un promotor de SP6 o un promotor de T3.

En ciertos casos, el método para producir la partícula de arnavirus trisegmentada puede comprender además

introducir en una célula hospedante el ADNc de la partícula de arnavirus trisegmentada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo. En ciertos casos, el método para producir la partícula de arnavirus trisegmentada puede comprender además introducir en una célula hospedante el ADNc de la partícula de arnavirus trisegmentada que comprende una

5 secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo, en donde la célula hospedante expresa todos los demás componentes para la producción de la partícula de arnavirus trisegmentada; y purificar la partícula de arnavirus trisegmentada del líquido sobrenadante de la célula hospedante. Dichos métodos son bien conocidos por los expertos en la técnica.

En el presente documento se describen líneas celulares, cultivos y métodos de cultivo de células infectadas con ácidos nucleicos, vectores y composiciones. En la Sección 5.7 se proporciona una descripción más detallada de los ácidos nucleicos, sistemas de vectores y líneas celulares.

10

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

15

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

También se proporcionan en el presente documento composiciones que comprenden la partícula de arnavirus trisegmentada como se describe en las secciones 5.8 y 5.9.

20

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

Según la invención, la partícula de arnavirus trisegmentada 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, al menos 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 la recombinación (RAG1), y haber sido infectados con 10^4 PFU de la partícula de arnavirus trisegmentada (véase la sección 5.10.14). 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 pases, al menos 20 pases, al menos 30 pases, al menos 40 pases o al menos 50 pases.

25

30

La partícula de arnavirus trisegmentada con todos los genes virales en sus respectivas posiciones naturales 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 de arnavirus trisegmentado consiste en un segmento L y dos segmentos S, en los que se inserta una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo proporcionado en el presente documento en una posición en cada segmento S. Más específicamente, un segmento S codifica la GP y un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo, respectivamente. El otro segmento S codifica un antígeno tumoral, un antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo y la NP, respectivamente. El segmento L codifica la proteína L y la proteína Z. Todos los segmentos están flanqueados por las respectivas 5' y 3' UTR.

35

40

En ciertas realizaciones, la recombinación intersegmentaria de los dos segmentos S de la partícula de arnavirus trisegmentada, que une los dos ORF de arnavirus 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 un 3' UTR-----3' UTR), en donde cada UTR que forma un extremo del genoma es una secuencia repetida invertida del otro extremo del mismo genoma.

45

En determinadas realizaciones, la partícula de arnavirus trisegmentada que comprende un segmento L y dos segmentos S se ha genomanipulado para llevar un ORF de arnavirus en una posición distinta de la posición natural del ORF y una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo. En otras realizaciones, la partícula de arnavirus trisegmentada que comprende un segmento L y dos segmentos S se ha genomanipulado para llevar 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 diferente de la posición natural. 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. Por lo tanto, 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

50

55

trisegmentada se han genomanipulado para llevar uno de sus ORF en una posición distinta de la posición natural. En realizaciones más específicas, los dos segmentos S comprenden un complemento completo de los ORF del segmento S. En determinadas realizaciones específicas, el segmento L se ha genomanipulado para llevar un ORF en una posición distinta de la posición natural o el segmento L puede ser el segmento genómico natural.

5 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;

10 (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 la 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.

15 En ciertas realizaciones, 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 naturales p. ej., GP o NP). En realizaciones específicas, 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)).

20 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 intersegmentaria 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 se compone de dos 3' UTR en lugar de una 3' UTR y una 5'UTR).

Tabla 2A

25 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 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.

30 *ORF indica que se ha insertado una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo.

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
*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

ES 2 922 981 T3

Posición 1	Posición 2	Posición 3	Posición 4	Posición 5	Posición 6
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	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	GP	*ORF	L
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 de segmento S o segmento L de arnavirus; la IGR entre la posición tres y cuatro puede ser una IGR de segmento S o segmento L de arnavirus; y la IGR entre la posición cinco y seis puede ser una IGR de segmento L de arnavirus. En una realización específica, la IGR entre la posición uno y la posición dos puede ser una IGR de segmento S de arnavirus; la IGR entre la posición tres y cuatro puede ser una IGR de segmento S de arnavirus; y la IGR entre la posición cinco y seis puede ser una IGR de 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 intersegmentaria 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 se compone de dos 5' UTR en lugar de una 3' UTR y una 5' UTR).

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

En ciertas realizaciones, un experto en la técnica podría construir un genoma de arnavirus con una organización como se ilustra en la tabla 2A y como se describe en el presente documento, y luego usar un ensayo como se describe en la

sección 5.10 para determinar si la partícula de arnavirus trisegmentada es genéticamente estable, es decir, no da como resultado una partícula vírica bisegmentada competente para la replicación como se describe en el presente documento.

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

5 En el presente documento se describe una partícula de arnavirus trisegmentada que comprende dos segmentos L y un segmento S. En ciertos casos, 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 casos específicos, 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 recombinación (RAG1), y haber sido infectados con 10⁴ PFU de la partícula de arnavirus trisegmentada (véase la sección 5.10.14). En otros casos, 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 pases, 20 pases, 30 pases, 40 pases o 50 pases.

15 En ciertos casos, la recombinación intersegmentaria de los dos segmentos L de la partícula de arnavirus trisegmentada, que une los dos ORF de arnavirus 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 un 3' UTR-----3' UTR), en donde cada UTR que forma un extremo del genoma es una secuencia repetida invertida del otro extremo del mismo genoma.

20 En ciertos casos, la partícula de arnavirus trisegmentada que comprende dos segmentos L y un segmento S se ha genomanipulado para llevar un ORF de arnavirus en una posición diferente de la posición natural del ORF y una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo. En otros casos, la partícula de arnavirus trisegmentada que comprende dos segmentos L y un segmento S se ha genomanipulado para llevar 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 diferente de la posición natural. En casos específicos, la partícula de arnavirus trisegmentada que comprende dos segmentos L y un segmento S comprende un complemento completo de los cuatro ORF de arnavirus. Por lo tanto, en algunos casos, la partícula de arnavirus trisegmentada es una partícula de arnavirus trisegmentada infecciosa y competente para la replicación. En casos específicos, los dos segmentos L de la partícula de arnavirus trisegmentada se han genomanipulado para llevar uno de sus ORF en una posición distinta de la posición natural. En casos más específicos, los dos segmentos L comprenden un complemento completo de los ORF del segmento L. En ciertos casos específicos, el segmento S se genomanipulado para llevar uno de sus ORF en una posición diferente de la posición natural o el segmento S puede ser el segmento genómico de tipo natural.

En determinados casos, uno de los dos segmentos L puede ser:

- 35 (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
 40 (vi) un segmento L, en donde el ORF que codifica la proteína Z está bajo el control de una 3' UTR de arnavirus.

La partícula de arnavirus trisegmentada que comprende dos segmentos L y un segmento S puede comprender un ORF duplicado (es decir, dos ORF de segmento L de tipo natural, p. ej., proteína Z o proteína L). En casos 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 intersegmentaria 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 segmento L está compuesto por dos 3' UTR en lugar de una 3' UTR y una 5' UTR). Basándose en 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 3A

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

ES 2 922 981 T3

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

5

*ORF indica que se ha insertado una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, un antígeno asociado a un tumor o un fragmento antigénico del mismo.

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	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
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

Posición 1	Posición 2	Posición 3	Posición 4	Posición 5	Posición 6
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

En ciertos casos, la IGR entre la posición uno y la posición dos puede ser una IGR de segmento S o de segmento L de arnavirus; la IGR entre la posición tres y cuatro puede ser una IGR de segmento S o de segmento L de arnavirus; y la IGR entre la posición cinco y seis puede ser una IGR de segmento L de arnavirus. En casos específicos, la IGR entre la posición uno y la posición dos puede ser una IGR de segmento L de arnavirus; la IGR entre la posición tres y cuatro puede ser una IGR de segmento L de arnavirus; y la IGR entre la posición cinco y seis puede ser una IGR de segmento S de arnavirus. En determinados casos, también son posibles otras combinaciones.

En ciertos casos, la recombinación intersegmentaria de un segmento L y un segmento S de la partícula de arnavirus trisegmentada que comprende dos segmentos L y un segmento S restablece un segmento funcional con dos genes virales en un solo segmento en lugar de dos segmentos separados. En otros casos, la recombinación intersegmentaria 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.

En ciertos casos, un experto en la técnica podría construir un genoma de arnavirus con una organización como se ilustra en la tabla 3A y como se describe en el presente documento, y luego usar un ensayo como se describe en la sección 5.10 para determinar si la partícula de arnavirus trisegmentada es genéticamente estable, es decir, no da como resultado una partícula vírica bisegmentada competente para la replicación como se describe en el presente documento.

5.2.3 Partícula de arnavirus trisegmentada de replicación deficiente

En determinadas realizaciones, la partícula de arnavirus trisegmentada es la partícula de arnavirus trisegmentada en la que (i) un ORF está en una posición distinta de la posición natural del ORF; o (ii) un ORF que codifica la GP, NP, proteína Z o proteína L se ha eliminado o inactivado funcionalmente de manera que el virus resultante no puede producir más partículas de virus de progenie infecciosas (es decir, es de replicación deficiente). En ciertas realizaciones, el tercer segmento de arnavirus puede ser un segmento S. En realizaciones más específicas, el tercer segmento de arnavirus se puede genomanipular para llevar un ORF en una posición distinta de la posición natural del ORF o el tercer segmento de arnavirus puede ser el segmento genómico de arnavirus de tipo natural. En realizaciones aún más específicas, el tercer segmento de arnavirus carece de un ORF de arnavirus que codifica la GP, NP, proteína Z o la proteína L.

Un segmento genómico trisegmentado puede ser un híbrido de un segmento S o L (es decir, un segmento genómico que puede ser una combinación del segmento S y el segmento L). El segmento híbrido puede ser un segmento S que comprenda una IGR de segmento L. El segmento híbrido puede ser un segmento L que comprenda una IGR de segmento S. El segmento híbrido puede ser una UTR de segmento S con una IGR de segmento L. El segmento híbrido puede ser una UTR de segmento L con una IGR de segmento S. El segmento híbrido puede ser una 5' UTR de segmento S con una IGR de segmento L o una 3' UTR de segmento S con una IGR de segmento L. El segmento híbrido puede ser una 5' UTR de segmento L con una IGR de segmento S o una 3' UTR de segmento L con una IGR de segmento S.

Una partícula de arnavirus trisegmentada que comprende un genoma modificado genéticamente en el que uno o más ORF se han eliminado o inactivado funcionalmente se puede producir en células de complementación (es decir, células que expresan el ORF de arnavirus que se ha eliminado o inactivado funcionalmente). El material genético de la partícula de arnavirus resultante puede transferirse tras la infección de una célula hospedante a la célula hospedante, en donde el material genético se puede expresar y amplificar. Además, el genoma de la partícula de arnavirus modificada genéticamente puede incluir una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo.

En ciertas realizaciones, se elimina al menos uno de los cuatro ORF que codifican la GP, NP, proteína Z y proteína L y se reemplaza por una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo. En otra realización, se puede eliminar al menos un ORF, al menos dos ORF, al menos tres ORF o al menos cuatro ORF que codifican la GP, NP, proteína Z y proteína L y reemplazar por una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo. En realizaciones específicas, se elimina solo uno de los cuatro ORF que codifican la GP, NP, proteína Z y proteína L y se reemplaza por una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo. En realizaciones más específicas, se elimina el ORF que codifica la GP del segmento genómico de arnavirus. En otra realización específica, se elimina el ORF que codifica la NP del segmento genómico de arnavirus. En realizaciones más específicas, se elimina el ORF que codifica la proteína Z del segmento genómico

de arenavirus. En otra realización específica más, se elimina el ORF que codifica la proteína L.

En determinadas realizaciones, una partícula de arenavirus trisegmentada comprende un segmento L y dos segmentos S en los que (i) un ORF está en una posición distinta de la posición natural del ORF; y (ii) se ha eliminado o inactivado funcionalmente un ORF que codifica la GP o NP, de manera que el virus resultante es de replicación deficiente y no es infeccioso. En una realización específica, se elimina un ORF y se reemplaza por una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo. En otra realización específica, se eliminan dos ORF y se reemplazan por una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo. En otras realizaciones específicas, se eliminan tres ORF y se reemplazan por una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo. En realizaciones específicas, se elimina el ORF que codifica la GP y se reemplaza por una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo. En otras realizaciones específicas, se elimina el ORF que codifica la NP y se reemplaza por una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo. En realizaciones aún más específicas, se eliminan el ORF que codifica la NP y el ORF que codifica la GP y reemplazan por una o dos secuencias de nucleótidos que codifican antígenos tumorales, antígenos asociados a tumores o fragmentos antigénicos de los mismos. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, la partícula de arenavirus trisegmentada comprende (i) un segmento L y dos segmentos S; (ii) un ORF en una posición distinta de la posición natural del ORF; (iii) una o más secuencias de nucleótidos que codifican antígenos tumorales, antígenos asociados a tumores o fragmentos antigénicos de los mismos.

En el presente documento se describe una partícula de arenavirus trisegmentada que comprende dos segmentos L y un segmento S en el que (i) un ORF está en una posición distinta de la posición natural del ORF; y (ii) un ORF que codifica la proteína Z y/o la proteína L se ha eliminado o inactivado funcionalmente, de manera que el virus resultante es de replicación deficiente y no es infeccioso. En un caso específico, se elimina un ORF y se reemplaza por una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo. En otro caso específico, se eliminan dos ORF y se reemplazan por una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo. En casos específicos, se elimina el ORF que codifica la proteína Z y se reemplaza por una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo. En otros casos específicos, se elimina el ORF que codifica la proteína L y se reemplaza por una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo. En casos aún más específicos, se eliminan el ORF que codifica la proteína Z y el ORF que codifica la proteína L y se reemplazan por una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo. Así, en ciertos casos, la partícula de arenavirus trisegmentada comprende (i) dos segmentos L y un segmento S; (ii) un ORF en una posición distinta de la posición natural del ORF; (iii) una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo.

Así, en ciertos casos, la partícula de arenavirus trisegmentada comprende una partícula de arenavirus trisegmentada (es decir, un segmento L y dos segmentos S o dos segmentos L y un segmento S) que i) está genomanipulada para llevar un ORF en una posición no natural; ii) se elimina un ORF que codifica la GP, NP, proteína Z o proteína L; iii) el ORF que se elimina se reemplaza por una o más secuencias de nucleótidos que codifican antígenos tumorales, antígenos asociados a tumores o fragmentos antigénicos de los mismos.

En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos que codifica un fragmento antigénico tiene de 8 a 100 nucleótidos de longitud, de 15 a 100 nucleótidos de longitud, de 25 a 100 nucleótidos de longitud, de 50 a 200 nucleótidos de longitud, de 50 a 400 nucleótidos de longitud, de 200 a 500 de nucleótidos de longitud, o de 400 a 600 nucleótidos de longitud, de 500 a 800 nucleótidos de longitud. En otras realizaciones, la secuencia de nucleótidos que codifica un fragmento antigénico tiene de 750 a 900 nucleótidos de longitud, de 800 a 1000 nucleótidos de longitud, de 850 a 1000 nucleótidos de longitud, de 900 a 1200 nucleótidos de longitud, de 1000 a 1200 nucleótidos de longitud, de 1000 a 1500 nucleótidos o 10 a 1500 nucleótidos de longitud 1500 a 2000 nucleótidos de longitud 1700 a 2000 nucleótidos de longitud, 2000 a 2300 nucleótidos de longitud 2200 a 2500 nucleótidos de longitud, 2500 a 3000 nucleótidos de longitud, 3000 a 3200 nucleótidos de longitud, de 3000 a 3500 nucleótidos de longitud, de 3200 a 3600 nucleótidos de longitud, 3300 a 3800 nucleótidos de longitud, 4000 nucleótidos a 4400 nucleótidos de longitud, de 4200 a 4700 nucleótidos de longitud, de 4800 a 5000 nucleótidos de longitud, de 5000 a 5200 nucleótidos de longitud, de 5200 a 5500 nucleótidos de longitud, de 5500 a 5800 nucleótidos de longitud, de 5800 a 6000 nucleótidos de longitud, de 6000 a 6400 nucleótidos de longitud, de 6200 a 6800 nucleótidos de longitud, de 6600 a 7000 nucleótidos de longitud, de 7000 a 7200 nucleótidos de longitud, de 7200 a 7500 nucleótidos de longitud, o 7500 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos codifica un péptido o polipéptido que tiene de 5 a 10 aminoácidos de longitud, de 10 a 25 aminoácidos de longitud, de 25 a 50 aminoácidos de longitud, de 50 a 100 aminoácidos de longitud, de 100 a 150 aminoácidos de longitud, 150 a 200 aminoácidos de longitud, 200 a 250 aminoácidos de longitud, de 250 a 300 aminoácidos de longitud, de 300 a 400 aminoácidos de longitud, de 400 a 500 aminoácidos de longitud, de 500 a 750 aminoácidos de longitud, de 750 a 1000 aminoácidos de longitud, 1000 a 1250 aminoácidos de longitud, de 1250 a 1500 aminoácidos de longitud, de 1500 a 1750 aminoácidos de longitud, 1750 a 2000 aminoácidos de longitud, de 2000 a 2500 aminoácidos de longitud, o más de 2500 o más aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido que no supera 2500 aminoácidos de longitud. En realizaciones específicas, la secuencia de nucleótidos no contiene un codón de parada.

En ciertas realizaciones, la secuencia de nucleótidos está optimizada en codones. En determinadas realizaciones, se puede optimizar la composición de nucleótidos, la composición de pares de nucleótidos o ambas. Las técnicas para dichas optimizaciones se conocen en la técnica y se pueden aplicar para optimizar una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, un antígeno asociado a un tumor o un fragmento antigénico del mismo.

5 Cualquier secuencia de nucleótidos que codifique un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo puede incluirse en la partícula de arnavirus trisegmentada. En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo es capaz de provocar una respuesta inmunitaria.

10 En determinadas realizaciones, el crecimiento y la infectividad de la partícula de arnavirus no están afectados por la secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo.

15 Se pueden utilizar técnicas conocidas por los expertos en la técnica para producir una partícula de arnavirus que comprende un segmento genómico de arnavirus genomanipulado para llevar un ORF de arnavirus en una posición distinta de la posición natural y una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo. Por ejemplo, pueden usarse técnicas de genética inversa para generar dicha partícula de arnavirus. En otras realizaciones, la partícula de arnavirus de replicación deficiente (es decir, el segmento genómico de arnavirus genomanipulado para llevar un ORF de arnavirus en una posición distinta de la posición natural, en donde se ha eliminado un ORF que codifica la GP, NP, proteína Z, proteína L) puede producirse en una célula complementaria.

20 En ciertas realizaciones, una partícula de arnavirus trisegmentada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo comprende además al menos una secuencia de nucleótidos que codifica al menos un péptido, polipéptido o proteína inmunomoduladores. En ciertas realizaciones, el péptido, polipéptido o proteína inmunomoduladores es la calreticulina (CRT), o un fragmento de la misma; ubiquitina o un fragmento de la misma; factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), o un fragmento del mismo; cadena invariable (CD74) o un fragmento antigénico de la misma; proteína de choque térmico 70 de Mycobacterium tuberculosis o un fragmento antigénico de la misma; proteína VP22 del virus del herpes simplex 1 o un fragmento antigénico de la misma; ligando CD40 o un fragmento antigénico del mismo; o ligando de tirosina quinasa 3 relacionado con Fms (Flt3) o un fragmento antigénico del mismo.

30 Los arnavirus para usar con los métodos y composiciones en el contexto de la invención pueden ser virus del Viejo Mundo, por ejemplo, virus Lassa, virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), virus Mobala, virus Mopeia o virus Ippy, o virus del Nuevo Mundo, por ejemplo, virus Amapari, virus Flexal, virus Guanarito, virus Junín, virus Latino, virus Machupo, virus Oliveros, virus Paraná, virus Pichinde, virus Pirital, virus Sabiá, virus Tacaribe, virus Tamiami, virus Cañón del Oso o virus Arroyo Agua Blanca.

35 En ciertas realizaciones, se proporciona la partícula de arnavirus trisegmentada para usar como una vacuna y métodos para usar dicha partícula de arnavirus en una vacunación y tratamiento de una enfermedad neoplásica, por ejemplo, cáncer. Se proporciona una descripción más detallada de los métodos de uso de la partícula de arnavirus descrita en el presente documento en la sección 5.8

40 En ciertas realizaciones, la partícula de arnavirus trisegmentada es adecuada para usar como una composición farmacéutica y se proporcionan métodos para usar dicha partícula de arnavirus en una vacunación y tratamiento de una enfermedad neoplásica, por ejemplo, cáncer. En la sección 5.9 se proporciona una descripción más detallada de los métodos de uso de la partícula de arnavirus descrita en el presente documento.

5.3 Partículas de arnavirus infecciosas, de replicación deficiente

Un arnavirus genéticamente modificado incluye el arnavirus que:

- es infeccioso;

45 - no puede formar virus de progenie infecciosos en una célula que no es de complementación (es decir, una célula que no expresa la funcionalidad que falta en el arnavirus de replicación deficiente y hace que sea deficiente en la replicación);

- es capaz de replicar su genoma y expresar su información genética; y

- codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo.

50 Un arnavirus modificado genéticamente descrito en el presente documento es infeccioso, es decir, se puede unir a una célula hospedante y liberar su material genético en la célula hospedante. Un arnavirus modificado genéticamente descrito en el presente documento es deficiente en la replicación, es decir, el arnavirus no puede producir más partículas de progenie infecciosas en una célula que no es de complementación. En particular, el genoma del arnavirus se modifica (p. ej., por la eliminación o inactivación funcional de un ORF) de modo que un virus que lleva

5 el genoma modificado ya no puede producir virus de progenie infecciosos. Una célula que no es de complementación es una célula que no proporciona la funcionalidad que se ha eliminado del arnavirus deficiente en la replicación por modificación del genoma del virus (p. ej., si el ORF que codifica la proteína GP se elimina o se inactiva funcionalmente, una célula que no es de complementación no proporciona la proteína GP). Sin embargo, un arnavirus genéticamente modificado es capaz de producir virus de progenie infecciosos en células de complementación. Las células de complementación son células que proporcionan (en trans) la funcionalidad que se ha eliminado del arnavirus de replicación deficiente por modificación del genoma del virus (p. ej., si el ORF que codifica la proteína GP se elimina o se inactiva funcionalmente, una célula de complementación proporciona la proteína GP). La expresión de la funcionalidad complementaria (p. ej., la proteína GP) se puede lograr por cualquier método conocido por el experto en la técnica (p. ej., expresión transitoria o estable). Un arnavirus genéticamente modificado puede amplificar y expresar su información genética en una célula que ha sido infectada por el virus. Un arnavirus modificado genéticamente puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo tal como, pero no limitado al antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo descrito en la sección 5.4.

15 En un arnavirus genéticamente modificado, un ORF del genoma de arnavirus puede eliminarse o inactivarse funcionalmente de manera que el virus resultante no puede producir más partículas de virus de progenie infecciosas en células que no son de complementación. Una partícula de arnavirus que comprende un genoma modificado genéticamente en el que se elimina o inactiva funcionalmente un ORF se puede producir en células de complementación (es decir, en células que expresan el ORF de arnavirus que se ha eliminado o inactivado funcionalmente). El material genético de las partículas de arnavirus resultantes puede transferirse tras la infección de una célula hospedante a la célula hospedante, en donde el material genético se puede expresar y amplificar. Además, el genoma de las partículas de arnavirus modificadas genéticamente codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo que puede expresarse en la célula hospedante.

25 Un ORF del arnavirus se puede eliminar o inactivar funcionalmente y reemplazar por un nucleótido que codifica un antígeno tumoral o antígeno asociado a tumor. Específicamente, se puede eliminar o inactivar funcionalmente el ORF que codifica la glicoproteína GP del arnavirus. En ciertos casos, la inactivación funcional de un gen elimina cualquier producto de traducción. En ciertos casos, la inactivación funcional se refiere a una alteración genética que permite algo de traducción; sin embargo, el producto de la traducción ya no es funcional y no puede reemplazar a la proteína de tipo natural.

30 En ciertos casos, el ORF que codifica la glicoproteína (GP) del arnavirus se elimina para generar un arnavirus de replicación deficiente para su uso y en las composiciones proporcionadas en el presente documento. Específicamente, el arnavirus de replicación deficiente puede comprender un segmento genómico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, una partícula de arnavirus modificada genéticamente comprende un segmento genómico que a) tiene una eliminación o inactivación funcional de un ORF que está presente en la forma natural del segmento genómico; y b) codifica (en paralelo o antiparalelo) un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo.

40 En determinadas realizaciones, el antígeno codificado por el nucleótido que se inserta en el genoma del arnavirus de replicación deficiente puede codificar, por ejemplo, un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo o combinaciones de antígenos tumorales, antígenos asociados a tumores o fragmentos antigénicos de los mismos, incluidos, pero no limitados a antígenos virales oncogénicos, antígenos de cáncer de testículo, antígenos oncofetales, antígenos de diferenciación tisular, antígenos de proteínas mutantes, neoantígenos, adipofilina, AIM-2, ALDH1A1, BCLX (L), BING-4, CALCA, CD45, CPSF, ciclina D1, DKK1, ENAH (hMcna), Ga733 (EpCAM), EphA3, EZH2, FGF5, gliptican-3, G250 /MN/CAIX, HER-2/neu, IDO1, IGF2B3, IL13Ralpha2, carboxil esterasa intestinal, alfafetoproteína, caliceína 4, KIF20A, Lengsin, M-CSF, MCSP, mdm-2, Meloe, MMP-2, MMP-7, MUC1, MUC5AC, p53 (no mutante), PAX5, PBF, PRAME, PSMA, RAGE, RAGE-1, RGS5, RhoC, RNF43, RU2AS, secernina 1, SOX10, STEAP1 (antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de la próstata 1), survivina, Telomerasa, VEGF, WT1, EGF-R, CEA, CD20, CD33, CD52, glicoproteína 100 (proteína GP100 o gp 100), MELANA/MART1, MART2, NY-ESO-1, p53, MAGE A1, MAGE A3, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, CDK4, alfa-actinina-4, ARTC1, BCR-ABL, 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, ETV6-AML, proteína de fusión ETV6-AML1, FLT3-ITD, FNI, GPNMB, proteína de fusión LDLR-fucosiltransferasaAS, NFYC, OGT, OS-9, proteína de fusión pml-RARalpha, PRDX5, PTPRK, H-ras, K-ras (oncogén viral de sarcoma de rata V-Ki-ras2 Kirsten), N-ras, RBAF600, SIRT2, SNRPDI, SSX, SSX2, proteína de fusión SYT-SSX1 o -SSX2, TGF-betaRIII, triosafosfato isomerasa, ormdm-2, LMP2, HPV E6/E7, EGFRvIII (factor de crecimiento epidérmico variante III), Idiotipo, GD2, gangliósido G2), Ras-mutante, p53 (mutante), proteinasa3 (PR1), tirosinasa, PSA, hTERT, puntos de corte de translocación de sarcoma, EphA2, fosfatasa ácida prostática PAP, neo-PAP, ML-IAP, AFP, ERG (gen de fusión TMPRSS2 ETS), NA17, PAX3, ALK, receptor de andrógenos, ciclina B1, ácido polisiálico, MYCN, TRP2, TRP2-Int2, GD3, fucosil GM1, mesotelina, PSCA, sLe(a), cyp1B1, PLAC1, GM3, BORIS, Tn, GLoboH, NY-BR-1, SART3, STn, anhidrasa carbónica IX, OY-TES1, proteína espermática 17, LCK, antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMWMAA), AKAP-4, SSX2, XAGE 1, B7H3, Legumina, Tie 2, Page4, VEGFR2, MAD-CT-1, FAP, PDGFR-beta, MAD-CT-2, antígeno 1 asociado con For, TRP1, CA-125, CA19-9, calretinina, antígeno de membrana epitelial (EMA), antígeno de tumor epitelial (ETA), CD19, CD34, CD99, CD117, cromogranina, citoqueratina, desmina, proteína ácida fibrilar glial

(GFAP), proteína de líquido de enfermedad quística macroscópica (GCDFFP-15), antígeno HMB-45, Myo-D1, actina específica de músculo (MSA), neurofilamento, enolasa neuronal específica (NSE), fosfatasa alcalina placentaria, sinaptofisina, tiroglobulina, factor de transcripción tiroidea 1, forma dimérica de la isoenzima piruvato quinasa tipo M2 (tumor M2-PK), BAGE BAGE-1, CAGE, CTAGE, FATE, GAGE, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, HCA661, HOM-TE5-85, MAGEA, MAGEB, MAGEC, NA88, NY-SAR-35, SPANXB1, SPA17, SSX, SYCP1, TPTE, carbohidrato/gangliósido GM2 (antígeno oncofetal-inmunogénico-1 OFA-I-1), GM3, CA 15-3 (CA 27.29\BCAA), CA 195, CA 242, CA 50, CAM 43, CEA, EBNA, EF2, antígeno del virus de Epstein-Barr, HLA-A2, HLA-A11, HSP70-2, KIAA0205, MUM-1, MUM-2, MUM-3, miosina clase I, GnTV, Herv-K-mel, LAGE-1, LAGE-2, (proteína espermática) SP17, SCP-1, P15(58), Hom/Mel-40, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR, TSP-180, P185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23H1, TAG-72, TAG-72-4, CA-72-4, CAM 17.1, NuMa, 13-catenina, P16, TAGE, CT7, 43-9F,5T4, 791Tgp72, 13HCG, BCA225, BTAA, CD68KP1, CO-029, HTgp-175, M344, MG7-Ag, MOV18, NB\70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90, TAAL6, TLP, TPS, CD22, CD27, CD30, CD70, proteína, TARP (proteína de marco de lectura alternativo gamma del receptor de células T), Trp-p8, integrina $\alpha\beta 3$ (CD61), galactina o Ral-B, CD123, CLL-1, CD38, CS-1, CD138, y ROR1. En la sección 5.4 se proporciona una descripción detallada de los antígenos descritos en el presente documento.

Los arnavirus para usar de acuerdo con la invención y con las composiciones proporcionadas en el presente documento pueden ser virus del Viejo Mundo, por ejemplo, virus Lassa, virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), virus Mobala, virus Mopeia o virus Ippy, o virus del Nuevo Mundo, por ejemplo, virus Amapari, Virus Flexal, virus Guanarito, virus Junín, virus Latino, virus Machupo, virus Oliveros, virus Paraná, virus Pichinde, virus Pirital, virus Sabiá, virus Tacaribe, virus Tamiami, virus Cañón del Oso o virus Arroyo Agua Blanca.

El genoma del arnavirus de tipo natural consiste en un segmento de ARN corto (~3,4 kb) y uno grande (~7,2 kb). El segmento corto lleva los ORF que codifican los genes de la nucleoproteína NP y la glicoproteína GP. El segmento grande comprende los genes de la ARN polimerasa L dependiente de ARN y de la proteína de matriz Z. Los arnavirus de tipo natural pueden volverse deficientes en replicación para generar vectores vacunales sustituyendo el gen de la glicoproteína por uno o más antígenos tumorales, antígenos asociados a tumores o fragmentos antigénicos de los mismos, contra los que se van a inducir respuestas inmunitarias.

Las partículas de arnavirus infecciosas de replicación deficiente que expresan un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo, o una combinación de antígenos tumorales, antígenos asociados a tumores o fragmentos antigénicos de los mismos, pueden usarse para tratar (de manera inmunoterapéutica) a sujetos que tienen una enfermedad neoplásica.

Se sabe que la enfermedad y la inmunosupresión por arnavirus en la infección por arnavirus de tipo natural son el resultado de una replicación viral no controlada. Al anular la replicación, es decir, la capacidad de producir partículas de virus de progenie infecciosas, de partículas de arnavirus por eliminación de su genoma, p. ej., el gen Z que se requiere para la liberación de partículas, o el gen GP que se requiere para la infección de las células diana, el número total de células infectadas puede estar limitado por el inóculo administrado, p. ej., a un receptor de la vacuna, o transmitido accidentalmente al personal implicado en aplicaciones médicas o biotecnológicas, o a los animales. Por lo tanto, la supresión de la replicación de partículas de arnavirus previene la patogénesis como resultado de la transmisión intencional o accidental de partículas de vector. Un aspecto importante se refiere a explotar la necesidad anterior de supresión de la replicación de una manera beneficiosa con el fin de expresar antígenos tumorales, antígenos asociados a tumores o fragmentos antigénicos de los mismos. Una partícula de arnavirus puede volverse deficiente en replicación mediante la modificación genética de su genoma. Tales modificaciones en el genoma pueden incluir:

- eliminación de un ORF (p. ej., el ORF que codifica la proteína GP, NP, L o Z);
- inactivación funcional de un ORF (p. ej., el ORF que codifica la proteína GP, NP, L o Z). Por ejemplo, esto se puede lograr introduciendo una mutación de cambio de sentido o una mutación sin sentido;
- 45 - cambio de la secuencia del ORF (p. ej., el intercambio de un sitio de escisión SIP con el sitio de escisión de otra proteasa);
- mutagénesis de uno de los extremos 5' o 3' de uno de los segmentos genómicos;
- mutagénesis de una región intergénica (es decir, del segmento genómico L o S).

Un arnavirus bisegmentado infeccioso de replicación deficiente que expresa un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo puede ser un virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) en donde el segmento S del virus se modifica sustituyendo el ORF que codifica la proteína GP por un ORF que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo.

Se puede diseñar un genoma de vector de arnavirus de tipo natural para retener al menos los elementos reguladores esenciales en las regiones no traducidas (UTR) 5' y 3' de ambos segmentos, y/o también las regiones intergénicas (IGR). Sin estar ligado a la teoría, los factores mínimos de acción en trans para la expresión génica en las células infectadas permanecen en el genoma del vector como ORF que se pueden expresar, aunque se pueden poner de manera diferente en el genoma y se pueden poner bajo el control de un promotor diferente al natural, o pueden

expresarse a partir de sitios internos de entrada al ribosoma. En determinadas realizaciones, el ácido nucleico que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo se transcribe a partir de uno de los promotores de arenavirus endógenos (es decir, 5' UTR, 3' UTR del segmento S, 5' UTR, 3' UTR del segmento L). En otras realizaciones, el ácido nucleico que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo se expresa a partir de secuencias de promotores heterólogos introducidas que pueden ser leídas por la ARN polimerasa dependiente de ARN viral, por la ARN polimerasa I celular, ARN polimerasa II o ARN polimerasa III, tal como duplicaciones de secuencias de promotores virales que se encuentran naturalmente en las UTR virales, el promotor de ARN ribosomal 28S, el promotor de beta-actina o el promotor de ARN ribosomal 5S, respectivamente. En determinadas realizaciones, los ácidos ribonucleicos que codifican un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo son transcritos y traducidos por sí mismos o como ultralectura por fusión a los ORF de proteína de arenavirus, y la expresión de proteínas en la célula hospedante puede mejorarse introduciendo en la secuencia del transcrito viral en el(los) lugar(es) apropiado(s) uno o más, p. ej., dos, tres o cuatro, sitios internos de entrada al ribosoma.

En ciertas realizaciones, el vector generado para codificar uno o más antígenos tumorales, antígenos asociados a tumores o fragmentos antigénicos de los mismos puede estar basado 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 nº12, HP65-2009, 200501927, 810362, 811316, 810316, 810366, 20112714, Douglas, GR01, SN05, CABN y sus derivados. En ciertas realizaciones, el vector generado para codificar uno o más antígenos tumorales, antígenos asociados a tumores o fragmentos antigénicos de los mismos puede estar basado en Clon 13 del LCMV. En otras realizaciones, el vector generado para codificar uno o más antígenos tumorales, antígenos asociados a tumores o fragmentos antigénicos de los mismos puede basarse en la cepa MP de LCMV.

En determinadas realizaciones, el vector generado para codificar uno o más antígenos tumorales, antígenos asociados a tumores o fragmentos antigénicos de los mismos puede estar basado en una cepa específica del virus Junín. Las cepas del virus Junín incluyen las cepas vacunales XJ13, XJnº44 y Candidnº1, así como IV4454, un aislado humano. En ciertas realizaciones, el vector generado para codificar uno o más antígenos tumorales, antígenos asociados a tumores o fragmentos antigénicos de los mismos se basa en la cepa Candid nº1 del virus Junín.

5.4 Antígenos tumorales, antígenos asociados a tumores y fragmentos antigénicos

En determinadas realizaciones, un antígeno tumoral o antígeno asociado a tumor para usar con los métodos y composiciones en el contexto de la invención es una proteína inmunogénica expresada en o sobre una célula neoplásica o un tumor, tal como una célula cancerosa o tumor maligno. En ciertas realizaciones, un antígeno tumoral o antígeno asociado a tumor para usar con los métodos y composiciones en el contexto de la invención es una proteína no específica, mutante, sobreexpresada o anormalmente expresada, que puede estar presente tanto en una célula neoplásica o tumoral como en una célula o tejido normal. En ciertas realizaciones, un antígeno tumoral o antígeno asociado a tumor para usar con los métodos y composiciones en el contexto de la invención es un antígeno específico de tumor que está restringido a células tumorales. En ciertas realizaciones, un antígeno tumoral para usar con los métodos y composiciones en el contexto de la invención es un antígeno específico de cáncer que está restringido a células cancerosas.

En determinadas realizaciones, un antígeno tumoral o antígeno asociado a tumor puede presentar una, dos, tres o más, incluyendo todas, de las siguientes características: sobreexpresado/acumulado (es decir, expresado tanto por tejido normal como neoplásico, pero altamente expresado en neoplasia), oncofetal (es decir, generalmente solo se expresa en tejidos fetales y en células somáticas cancerosas), oncovirales o virales oncogénicos (es decir, codificado por virus transformadores tumorigénicos), de cáncer de testículo (es decir, expresado solo por células cancerosas y tejidos reproductivos adultos, p. ej., testículos), de linaje restringido (es decir, expresado en gran medida por un solo histotipo de cáncer), mutado (es decir, expresado únicamente en tejido neoplásico como resultado de mutación genética o alteración en la transcripción), alterado postraduccionalmente (p. ej., alteraciones asociadas a tumores en la glicosilación), o idiotípica (es decir, desarrollado a partir de expansiones clonales malignas de linfocitos B o T).

En ciertas realizaciones, el antígeno tumoral o antígeno asociado a tumor para usar con los métodos y composiciones en el contexto de la invención incluye antígenos de enfermedades neoplásicas que incluyen leucemia linfoblástica aguda; linfoma linfoblástico agudo; leucemia linfocítica aguda; leucemia mielógena aguda; leucemia mielóide aguda (adulto/infancia); carcinoma corticosuprarrenal; cánceres relacionados con el SIDA; linfoma relacionado con el SIDA; cáncer anal; cáncer de apéndice; astrocitomas; tumor teratoideo/rabdoideo atípico; carcinoma de células basales; cáncer de las vías biliares, extrahepático (colangiocarcinoma); cáncer de vejiga; osteosarcoma óseo/histiocitoma fibroso maligno; cáncer cerebral (adulto/infancia); tumor cerebral, astrocitoma cerebeloso (adulto/infancia); tumor cerebral, astrocitoma cerebral/tumor cerebral glioma maligno; tumor cerebral, ependimoma; tumor cerebral, meduloblastoma; tumor cerebral, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales; tumor cerebral, glioma de la vía óptica e hipotalámico; glioma del tronco encefálico; cáncer de mama; adenomas/carcinoides bronquiales; tumor bronquial; linfoma de Burkitt; cáncer en la infancia; tumor gastrointestinal carcinoide; tumor carcinoide; carcinoma del adulto, sitio primario desconocido; carcinoma de origen primario desconocido; tumor embrionario del sistema nervioso central; linfoma del sistema nervioso central, primario; cáncer de cuello uterino; carcinoma corticosuprarrenal en la infancia; cánceres infantiles; astrocitoma cerebral infantil; cordoma, infancia; leucemia linfocítica crónica; leucemia mielógena crónica; leucemia mielóide crónica; trastornos mieloproliferativos crónicos; cáncer de colon; cáncer

colorrectal; craneofaringioma; linfoma cutáneo de células T; tumor desmoplásico de células redondas pequeñas; enfisema; cáncer endometrial;ependimoblastoma;ependimoma;cáncer de esófago; sarcoma de Ewing en la familia de tumores de Ewing; tumor extracraneal de células germinales; tumor extragonadal de células germinales; cáncer de vías biliares extrahepáticas; cáncer de vesícula biliar; cáncer gástrico (de estómago); carcinoide gástrico; tumor carcinoide gastrointestinal; tumor del estroma gastrointestinal; tumor de células germinales: tumor trofoblástico gestacional extracraneal, extragonadal u ovárico; tumor trofoblástico gestacional, sitio primario desconocido; glioma; glioma del tronco encefálico; glioma, vía óptica e hipotalámico infantil; leucemia de células pilosas; cáncer de cabeza y cuello de Hodgkin; cáncer de corazón; cáncer hepatocelular (hígado); linfoma de Hodgkin; cáncer de hipofaringe; glioma hipotalámico y de la vía óptica; melanoma intraocular; carcinoma de células de los islotes (páncreas endocrino); sarcoma de Kaposi; cáncer de riñón (cáncer de células renales); histiocitosis de células de Langerhans; cáncer de laringe; cáncer de labio y cavidad oral; liposarcoma; cáncer de hígado (primario); cáncer de pulmón no microcítico; cáncer de pulmón microcítico; linfoma primario del sistema nervioso central; macroglobulinemia, Waldenström; cáncer de mama masculino; histiocitoma fibroso maligno de hueso/osteosarcoma; meduloblastoma; meduloepitelioma; melanoma; melanoma, intraocular (ojo); cáncer de células de Merkel; carcinoma de piel de células de Merkel; mesotelioma; mesotelioma, adulto maligno; cáncer de cuello escamoso metastásico con tumor primario oculto; cáncer de boca; síndrome de neoplasia endocrina múltiple; mieloma múltiple/neoplasia de células plasmáticas; micosis fungoide, síndromes mielodisplásicos; enfermedades mielodisplásicas/mieloproliferativas; leucemia mielógena, crónica; leucemia mielóide, aguda del adulto; leucemia mielóide aguda infantil; mieloma, múltiple (cáncer de la médula ósea); trastornos mieloproliferativos crónicos; cáncer de cavidad nasal y senos paranasales; carcinoma nasofaríngeo; neuroblastoma, cáncer de pulmón de no células pequeñas; linfoma no Hodgkin; oligodendroglioma; cáncer oral; cáncer de cavidad oral; cáncer orofaríngeo; osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno de hueso; cáncer de ovario; cáncer epitelial de ovario (tumor del estroma epitelial superficial); tumor de células germinales de ovario; tumor de ovario de bajo potencial maligno; cáncer pancreático; cáncer pancreático, células de los islotes; papilomatosis; cáncer de seno paranasal y cavidad nasal; cáncer de paratiroides; cáncer de pene; cáncer de faringe; feocromocitoma; astrocitoma pineal; germinoma pineal; tumores del parénquima pineal de diferenciación intermedia; pineoblastoma y tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales; tumor hipofisario; 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);, cáncer de células de transición de la pelvis renal y uréter; carcinoma del tracto respiratorio que implica el gen NUT en el cromosoma 15; retinoblastoma; rhabdomyosarcoma, infancia; cáncer de glándulas salivales; sarcoma, familia de tumores de Ewing; síndrome de Sézary; cáncer de piel (melanoma); cáncer de piel (no melanoma); cáncer de pulmón microcítico; cáncer de intestino delgado sarcoma de tejidos blandos; sarcoma de tejidos blandos; tumor de la médula espinal; carcinoma de células escamosas; cáncer de cuello escamoso con primario oculto, metastásico; cáncer de estómago (gástrico); tumor neuroectodérmico primitivo supratentorial; linfoma de células T, cutáneo (Micosis Fungoide y Síndrome de Sézary); cáncer testicular; cáncer de garganta; timoma; carcinoma de timoma y tímico; cáncer de tiroides; cáncer de tiroides, infantil; cáncer de células de transición de la pelvis renal y el uréter; cáncer de uretra; cáncer de útero, endometrio; sarcoma uterino; cáncer de vagina; cáncer de vulva; y Tumor de Wilms.

En ciertas realizaciones, el antígeno tumoral o el antígeno asociado a tumor para usar con los métodos y composiciones en el contexto de la invención incluye antígenos virales oncogénicos, antígenos de cáncer de testículo, antígenos oncofetales, antígenos de diferenciación de tejidos, antígenos de proteínas mutantes, neoantígeno, adipofilina, AIM-2, ALDH1A1, BCLX (L), BING-4, CALCA, CD45, CPSF, ciclina D1, DKKI, ENAH (hMcna), Ga733 (EpCAM), EphA3, EZH2, FGF5, glipican-3, G250 /MN/CAIX, HER-2/neu, IDO1, IGF2B3, IL13Ralpha2, carboxil esterasa intestinal, alfa-fetoproteína, calicreína 4, KIF20A, Lengsin, M-CSF, MCSP, mdm-2, Meloe, MMP-2, MMP-7, MUC1, MUC5AC, p53 (no mutante), PAX5, PBF, PRAME, PSMA, RAGE, RAGE-1, RGS5, RhoC, RNF43, RU2AS, secernina 1, SOX10, STEAP1 (antígeno epitelial de seis dominios transmembranas de la próstata 1), survivina, telomerasa, VEGF, WT1, EGF-R, CEA, CD20, CD33, CD52, glicoproteína 100 (proteína GP100 o gp 100), MELANA/MART1, MART2,NY-ESO-1, p53, MAGE A1, MAGE A3, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, CDK4, alfa-actinina-4, A RTC1, BCR-ABL, 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, ETV6-AML, proteína de fusión ETV6-AML1, FLT3-ITD, FN1, GPNMB, proteína de fusión LDLR-fucosiltransferasaAS, NFYC, OGT, OS-9, proteína de fusión pml-RARalfa, PRDX5, PTPRK, H-ras, K-ras (oncogén viral del sarcoma de rata Kirsten V-Ki-ras2), N-ras, RBAF600, SIRT2, SNRPD1, SSX, SSX2, proteína de fusión SYT-SSX1 o -SSX2, TGF-betaRII, triosafosfato isomerasa, ormdm-2, LMP2, HPV E6/E7, EGFRvIII (factor de crecimiento epidérmico variante III), Idiotipo, GD2, gangliósido G2), mutante Ras, p53 (mutante), proteinasa3 (PR1), tirosinasa, PSA, hTERT, puntos de corte de translocación de sarcoma, EphA2, fosfatasa ácida prostática PAP, neo-PAP, ML-IAP, AFP, ERG (gen de fusión TMPRSS2 ETS), NA17, PAX3, ALK, receptor de andrógenos, ciclina B1, ácido polisialílico, MYCN, TRP2, TRP2-Int2, GD3, fucosil GM1, mesotelina, PSCA, sLe(a), cyp1B1, PLAC1, GM3, BORIS, Tn, GLobH, NY-BR-1, SART3, STn, anhidrasa carbónica IX, OY-TES1, Proteína espermática 17, LCK, antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMWMAA), AKAP-4, SSX2, XAGE 1, B7H3, Legumina, Tie 2, Page4, VEGFR2, MAD-CT-1, FAP, PDGFR-beta, MAD-CT-2, antígeno 1 relacionado con For, TRP1, CA-125, CA19-9, calretinina, antígeno de membrana epitelial (EMA), antígeno tumoral epitelial (ETA), CD19, CD34, CD99, CD117, cromogranina, citoqueratina, desmina, proteína ácida fibrilar glial (GFAP), proteína del líquido de la enfermedad alérgica macroscópica (GCDFFP-15), antígeno HMB-45, Myo-D1, actina específica del músculo (MSA), neurofilamento, enolasa neuroespecífica (NSE), fosfatasa alcalina placentaria, sinaptofisina, tiroglobulina, factor de transcripción tiroidea 1, forma dimérica de la isoenzima piruvato quinasa tipo M2 (tumor M2-PK), BAGE BAGE-1, CAGE, CTAGE, FATE, GAGE, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-

4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, HCA661, HOM-TES-85, MAGEA, MAGEB, MAGEC, NA88, NY-SAR-35, SPANXB1, SPA17, SSS, SYCP1, TPTE, carbohidrato/gangliósido GM2 (antígeno oncofetal-inmunogénico-1 OFA-I-1), GM3, CA 15-3 (CA 27.29\BCAA), CA 195, CA 242, CA 50, CAM 43, CEA, EBNA, EF2, antígeno del virus de Epstein-Barr, HLA-A2, HLA-A11, HSP70-2, KIAA0205, MUM-1, MUM-2, MUM-3, miosina clase I, GnTV, Herv-K-mel, LAGE-1, LAGE-2, (proteína espermática) SP17, SCP-1, P15(58), Hom/Mel-40, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR, TSP-180, P185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23H1, TAG-72, TAG-72-4, CA-72-4, CAM 17.1, NuMa, 13-catenina, P16, TAGE, CT7, 43-9F.5T4, 791Tgp72, 13HCG, BCA225, BTAA, CD68\KP1, CO-029, HTgp-175, M344, MG7-Ag, MOV18, NB\70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90, TAAL6, TLP, TPS, CD22, CD27, CD30, CD70, prostetina, TARP (proteína de marco lectura alternativo gamma del receptor de células T), Trp-p8, integrina $\alpha\beta 3$ (CD61), galactina o Ral-B, CD123, CLL-1, CD38, CS-1, CD138 y ROR1.

En determinadas realizaciones, el antígeno tumoral o antígeno asociado a tumor para usar con los métodos y composiciones en el contexto de la invención incluye antígenos virales oncogénicos, en donde los antígenos virales oncogénicos son antígenos del virus del papiloma humano (HPV), antígenos del virus del herpes asociado al sarcoma de Kaposi, tal como el antígeno nuclear asociado a la latencia, antígenos del virus de Epstein-Barr, tales como EBV-EA, EBV-MA o EBV-VCA, antígenos del poliomavirus de células de Merkel, tales como el antígeno MCV T o antígenos del virus linfotrópico humano de células T, tal como el antígeno Tax HTLV-1.

En ciertas realizaciones, el antígeno tumoral o antígeno asociado a tumor es un neoantígeno. Un "neoantígeno", tal como se usa en el presente documento, significa un antígeno que surge por mutación en una célula tumoral y dicho antígeno generalmente no se expresa en células o tejidos normales. Sin estar ligado a la teoría, debido a que los tejidos sanos generalmente no poseen estos antígenos, los neoantígenos representan un objetivo preferido. Además, sin estar ligados a ninguna teoría, en el contexto de la presente invención, dado que las células T que reconocen el neoantígeno pueden no haber sufrido una selección tímica negativa, dichas células pueden tener una gran avidéz por el antígeno y generar una fuerte respuesta inmunitaria contra los tumores, a la vez que carece del riesgo de inducir la destrucción del tejido normal y el daño autoinmunitario. En determinadas realizaciones, el neoantígeno es un neoantígeno restringido por MHC de clase I. En ciertas realizaciones, el neoantígeno es un neoantígeno restringido por MHC de clase II. En ciertas realizaciones, una mutación en una célula tumoral del paciente da como resultado una nueva proteína que produce el neoantígeno.

En ciertas realizaciones, el antígeno tumoral o antígeno asociado a tumor puede ser un ortólogo de antígeno, p. ej., un mamífero (es decir, primate no humano, cerdo, perro, gato o caballo) para un antígeno tumoral humano o antígeno asociado a tumor.

En determinadas realizaciones, un fragmento antigénico de un antígeno tumoral o antígeno asociado a tumor está codificado por la secuencia de nucleótidos incluida en el arnavirus. En determinadas realizaciones, un fragmento es antigénico cuando es capaz de (i) provocar una respuesta inmunitaria de anticuerpos en un hospedante (p. ej., ratón, conejo, cabra, burro o ser humano) en donde los anticuerpos resultantes se unen específicamente a una proteína inmunogénica expresada en o sobre una célula neoplásica (p. ej., una célula cancerosa); y/o (ii) provocar una respuesta inmunitaria de células T específica.

En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos que codifica un fragmento antigénico de un antígeno tumoral o un antígeno asociado a tumor es de 8 a 100 nucleótidos de longitud, de 15 a 100 nucleótidos de longitud, de 25 a 100 nucleótidos de longitud, de 50 a 200 nucleótidos de longitud, de 50 a 400 nucleótidos de longitud, 200 a 500 nucleótidos de longitud, o de 400 a 600 nucleótidos de longitud, de 500 a 800 nucleótidos de longitud. En otras realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene es de 750 a 900 nucleótidos de longitud, de 800 a 1000 nucleótidos de longitud, de 850 a 1000 nucleótidos de longitud, de 900 a 1200 nucleótidos de longitud, de 1000 a 1200 nucleótidos de longitud, de 1000 a 1500 nucleótidos o de 10 a 1500 nucleótidos de longitud, de 1500 a 2000 nucleótidos de longitud, de 1700 a 2000 nucleótidos de longitud, de 2000 a 2300 nucleótidos de longitud, de 2200 a 2500 nucleótidos de longitud, de 2500 a 3000 nucleótidos de longitud, de 3000 a 3200 nucleótidos de longitud, de 3000 a 3500 nucleótidos de longitud, de 3200 a 3600 nucleótidos de longitud, de 3300 a 3800 nucleótidos de longitud, de 4000 nucleótidos a 4400 nucleótidos de longitud, de 4200 a 4700 nucleótidos de longitud, de 4800 a 5000 nucleótidos de longitud, de 5000 a 5200 nucleótidos de longitud, de 5200 a 5500 nucleótidos de longitud, de 5500 a 5800 nucleótidos de longitud, de 5800 a 6000 nucleótidos de longitud, de 6000 a 6400 nucleótidos de longitud, de 6200 a 6800 nucleótidos de longitud, de 6600 a 7000 nucleótidos de longitud, de 7000 a 7200 nucleótidos de longitud, de 7200 a 7500 nucleótidos de longitud, o 7500 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos codifica un péptido o polipéptido que tiene de 5 a 10 aminoácidos de longitud, de 10 a 25 aminoácidos de longitud, de 25 a 50 aminoácidos de longitud, de 50 a 100 aminoácidos de longitud, de 100 a 150 aminoácidos ácidos de longitud, 150 a 200 aminoácidos de longitud, de 200 a 250 aminoácidos de longitud, de 250 a 300 aminoácidos de longitud, de 300 a 400 aminoácidos de longitud, de 400 a 500 aminoácidos de longitud, de 500 a 750 aminoácidos de longitud, 750 a 1000 aminoácidos de longitud, de 1000 a 1250 aminoácidos de longitud, de 1250 a 1500 aminoácidos de longitud, de 1500 a 1750 aminoácidos de longitud, de 1750 a 2000 aminoácidos de longitud, de 2000 a 2500 aminoácidos de longitud, o más de 2500 o más aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido que no supera 2500 aminoácidos de longitud. En realizaciones específicas, la secuencia de nucleótidos no contiene un codón de parada. En ciertas realizaciones, la secuencia de nucleótidos está optimizada en codones. En determinadas realizaciones, se puede optimizar la composición de nucleótidos, la composición de pares de nucleótidos o ambas. Las técnicas para dichas optimizaciones se conocen en la técnica y se

pueden aplicar para optimizar una secuencia de nucleótidos de un antígeno tumoral o antígeno asociado a tumor.

En determinadas realizaciones, el segmento genómico de arenavirus, la partícula de arenavirus o la partícula de arenavirus trisegmentada pueden comprender una o más secuencias de nucleótidos que codifican antígenos tumorales, antígenos asociados a tumores o fragmentos antigénicos de los mismos. En otras realizaciones, el segmento genómico de arenavirus, la partícula de arenavirus o la partícula de arenavirus trisegmentada pueden comprender al menos una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo, al menos dos secuencias de nucleótidos que codifican antígenos tumorales, antígenos tumorales asociados, o fragmentos antigénicos de los mismos, al menos tres secuencias de nucleótidos que codifican antígenos tumorales, antígenos asociados a tumores, o fragmentos antigénicos de los mismos, o más secuencias de nucleótidos que codifican antígenos tumorales, antígenos asociados a tumores, o fragmentos antigénicos de los mismos.

Las secuencias de ácido nucleico que codifican un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo pueden introducirse en el genoma de un arenavirus bisegmentado infeccioso, de replicación deficiente por sustitución de la secuencia de ácido nucleico del ORF de la glicoproteína GP, la proteína de la matriz Z, la nucleoproteína NP o la proteína polimerasa L. En otras realizaciones, la secuencia de ácido nucleico que codifica el antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo se fusiona con el ORF de la glicoproteína GP, la proteína de matriz Z, la nucleoproteína NP, o la proteína polimerasa L. La secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo, una vez insertado en el genoma de un arenavirus bisegmentado infeccioso, de replicación deficiente, puede transcribirse y/o expresarse bajo el control de los cuatro promotores de arenavirus (5' UTR y 3' UTR del segmento S, y 5' UTR y 3' UTR del segmento L), así como ácidos ribonucleicos que pueden ser insertados con elementos reguladores que pueden ser leídos por la ARN polimerasa dependiente de ARN viral, ARN polimerasa I celular, ARN polimerasa II o ARN polimerasa III, tal como duplicaciones de secuencias de promotores virales que se encuentran naturalmente en las UTR virales, el promotor de ARN ribosomal 28S, el promotor de beta-actina o el promotor de ARN ribosomal 5S, respectivamente. Los ácidos nucleicos que codifican el antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo pueden transcribirse y/o expresarse por sí mismos o como ultralectura mediante fusión con ORF y genes de arenavirus, respectivamente, y/o en combinación con uno o más, p. ej., dos, tres o cuatro sitios internos de entrada al ribosoma.

En determinadas realizaciones, una partícula de arenavirus que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo comprende además al menos una secuencia de nucleótidos que codifica al menos un péptido, polipéptido o proteína inmunomoduladores. En ciertas realizaciones, el péptido, polipéptido o proteína inmunomoduladores es la calreticulina (CRT), o un fragmento de la misma; ubiquitina o un fragmento de la misma; factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), o un fragmento del mismo; cadena invariable (CD74) o un fragmento antigénico de la misma; proteína de choque térmico 70 de Mycobacterium tuberculosis o un fragmento antigénico de la misma; proteína VP22 del virus del herpes simplex 1 o un fragmento antigénico de la misma; ligando CD40 o un fragmento antigénico del mismo; o ligando de tirosina quinasa 3 relacionado con Fms (Flt3) o un fragmento antigénico del mismo.

En ciertas realizaciones, una partícula de arenavirus comprende un segmento genómico que a) tiene una eliminación o inactivación funcional de un ORF que está presente en la forma de tipo natural del segmento genómico; y b) codifica (ya sea en paralelo o antiparalelo): (i) uno o más antígenos tumorales, antígenos asociados a tumores o un fragmento antigénico del mismo y (ii) uno o más péptidos, polipéptidos o proteínas inmunomoduladores

En ciertas realizaciones, la secuencia de nucleótidos que codifica el antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo y la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido, polipéptido o proteína inmunomoduladores están en la misma posición del genoma viral. En ciertas realizaciones, la secuencia de nucleótidos que codifica el antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo y la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido, polipéptido o proteína inmunomoduladores están en diferentes posiciones del genoma viral.

En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos que codifica el antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo y la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido, polipéptido o proteína inmunomoduladores se separan mediante una secuencia espaciadora. En ciertas realizaciones, la secuencia que codifica el antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo y la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido, polipéptido o proteína inmunomoduladores están separadas por un sitio interno de entrada de ribosoma, o una secuencia que codifica un sitio de escisión de proteasa. En ciertas realizaciones, la secuencia de nucleótidos que codifica el antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo y la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido, polipéptido o proteína inmunomoduladores están separadas por una secuencia de nucleótidos que codifica un conector o un péptido autoescindible. Se puede usar cualquier péptido conector o péptido autoescindible conocido por el experto con las composiciones y métodos en el contexto de la invención. Un ejemplo no limitante de un péptido conector es GSG. Los ejemplos no limitantes de un péptido autoescindible son el péptido 2A del teschovirus-1 porcino, el péptido 2A del virus Thosea asigna o el péptido 2A del virus de la fiebre aftosa.

En ciertas realizaciones, el antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo y el péptido, polipéptido o proteína inmunomoduladores se fusionan directamente entre sí. En ciertas realizaciones, el antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo y el péptido, polipéptido o proteína inmunomoduladores se fusionan entre sí a través de un conector peptídico. En ciertas realizaciones, el antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo y el péptido, polipéptido o proteína inmunomoduladores se separan entre sí a través de un péptido autoescindible. Un ejemplo no limitante de un conector peptídico es GSG. Los ejemplos no limitantes de un péptido autoescindible son el péptido 2A del teschovirus-1 porcino, el péptido 2A del virus Thossea asigna o el péptido 2A del virus de la fiebre aftosa.

En ciertas realizaciones, el antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo y el péptido, polipéptido o proteína inmunomoduladores se expresan en la misma partícula de arnavirus. En ciertas realizaciones, el antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo y el péptido, polipéptido o proteína inmunomoduladores se expresan en diferentes partículas de arnavirus. En ciertas realizaciones, el antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo y el péptido, polipéptido o proteína inmunomoduladores se expresan en diferentes virus de la misma cepa. En ciertas realizaciones, el antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo y el péptido, polipéptido o proteína inmunomoduladores se expresan en diferentes virus de diferentes cepas.

En determinadas realizaciones, una partícula de arnavirus generada para codificar uno o más antígenos tumorales, antígenos asociados a tumores o fragmentos antigénicos de los mismos comprende una o más secuencias de nucleótidos que codifican antígenos tumorales, antígenos asociados a tumores o fragmentos antigénicos de los mismos. En realizaciones específicas los antígenos tumorales o fragmentos antigénicos de los mismos están separados por uno o más conectores, espaciadores o sitios de escisión

5.5 Generación de una partícula de arnavirus y una partícula de arnavirus trisegmentada

En general, las partículas de arnavirus se pueden producir de forma recombinante mediante técnicas de genética inversa 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 arnavirus, estas técnicas se pueden aplicar como se describe a continuación. El genoma de los virus se puede modificar como se describe en el presente documento.

5.5.1 Marco de lectura abierto en posición no natural

La generación de una partícula de arnavirus que comprende un segmento genómico que se ha genomanipulado para llevar un ORF viral en una posición diferente de la posición natural del ORF y una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo se puede producir de forma recombinante mediante cualquier técnica de genética inversa conocida por un experto en la técnica.

(i) Partícula de arnavirus infecciosa y competente para la replicación

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

Una vez generadas a partir del ADNc, las partículas de arnavirus (p. ej., infecciosas y competentes para la replicación) pueden propagarse. En ciertas realizaciones, la partícula de arnavirus se puede propagar en cualquier célula hospedante que permita que el virus crezca hasta títulos que permitan los usos del virus como se describe en el presente documento. En una realización, la célula hospedante permite que la partícula de arnavirus crezca hasta títulos comparables a los determinados para el tipo natural correspondiente.

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

En determinadas realizaciones, las células hospedantes se mantienen en cultivo y se transfectan con uno o más plásmidos. El(los) plásmido(s) expresan el(los) segmento(s) genómico(s) de arnavirus que se van a generar bajo el control de uno o más casetes de expresión adecuados para la expresión en células de mamífero, p. ej., que consisten en un promotor y terminador de la polimerasa I.

Los plásmidos que se pueden usar 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 determinadas realizaciones, el plásmido que codifica una polimerasa de arnavirus que dirige la síntesis intracelular de los segmentos L y S virales puede incorporarse a la mezcla de transfección. Por ejemplo, puede estar presente un plásmido que codifica la proteína L y/o un plásmido que codifica la NP (pC-L y pC-NP, respectivamente). La proteína

L y la NP son los factores mínimos de acción en trans necesarios para la transcripción y replicación del ARN viral. Alternativamente, la síntesis intracelular de los segmentos L y S virales, junto con la NP y proteína L se puede llevar a cabo usando un casete de expresión con promotores de pol-I y pol-II leyendo desde lados opuestos en los ADNc de los segmentos L y S de dos plásmidos separados, respectivamente.

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

Además, el(los) plásmido(s) 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 mamífero, p. ej., el casete de expresión de la polimerasa II como antes, o el(los) transcrito(s) de genes virales van seguidos de un sitio interno de entrada al ribosoma, tal como el del virus de la encefalomiocarditis, seguido del 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 la ampicilina.
15

La transfección de una célula hospedante con un plásmido(s) se puede realizar utilizando cualquiera de las estrategias comúnmente utilizadas, tales como protocolos basados en fosfato de calcio, en liposomas o electroporación. Unos días más tarde se añade el agente de selección adecuado, p. ej., puromicina, en concentraciones valoradas. Los clones supervivientes se aíslan y subclonan siguiendo procedimientos estándar, y los clones de expresión alta se identifican utilizando procedimientos de transferencia Western o de citometría de flujo con anticuerpos dirigidos contra la(s) proteína(s) viral(es) de interés.
20

Para recuperar la partícula de arnavirus están previstos los siguientes procedimientos. Primer día: las células, normalmente con una confluencia de 80% en placas de pocillos M6, se transfectan con una mezcla de plásmidos, como se ha descrito anteriormente. Para ello, se pueden aprovechar las estrategias de uso común, tales como los protocolos basados en fosfato de calcio, en liposomas o la electroporación.
25

3-5 días después: se recoge el líquido sobrenadante cultivado (preparación del vector de arnavirus), se divide en partes alícuotas y se almacena a 4°C, -20°C u -80°C, dependiendo de cuánto tiempo deba almacenarse el vector de arnavirus antes de su uso. El título infeccioso de la preparación del vector de arnavirus se evalúa mediante un ensayo de inmunoenfoque. Alternativamente, las células transfectadas y el líquido sobrenadante se pueden pasar a un recipiente más grande (p. ej., un matraz de cultivo de tejidos T75) el día 3-5 después de la transfección, y el líquido sobrenadante del cultivo se recoge hasta cinco días después del pase.
30

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 se puede incorporar al plásmido usando enzimas de restricción.
35

(ii) Partícula de arnavirus infecciosa, de replicación deficiente

Las partículas de arnavirus infecciosas de replicación deficiente se pueden rescatar como se describe anteriormente. Sin embargo, una vez generados a partir del ADNc, los arnavirus infecciosos de replicación deficiente pueden propagarse en células de complementación. Las células de complementación son células que proporcionan la funcionalidad que se ha eliminado del arnavirus de replicación deficiente mediante la modificación de su genoma. (p. ej., si el ORF que codifica la proteína GP se elimina o se inactiva funcionalmente, una célula de complementación proporciona la proteína GP).
40

Debido a la eliminación o inactivación funcional de uno o más de los ORF en vectores de arnavirus (aquí se tomará como ejemplo la eliminación de la glicoproteína, GP), los vectores de arnavirus pueden generarse y expandirse en células que proporcionan *en trans* el(los) gene(s) viral(es) eliminados, p. ej., la GP en el presente ejemplo. Dicha línea celular de complementación, denominada en lo sucesivo células C, se genera por transfección de una línea celular tal como BHK-21, HEK 293, VERO u otra con uno o más plásmidos para la expresión del(los) gene(s) viral(es) de interés (plásmido de complementación, denominado plásmido C). El(los) plásmido(s) C expresan el(los) gen(es) viral(es) eliminado(s) en el vector de arnavirus que se va a generar bajo el control de uno o más casetes de expresión adecuados para la expresión en células de mamífero, p. ej., un promotor de polimerasa II de mamífero tal como el promotor EF1 alfa con una señal de poliadenilación. Además, el plásmido de complementación presenta 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., casete de expresión de la polimerasa II como se indicó anteriormente, o el(los) transcrito(s) del gen viral van 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 la ampicilina.
45
50
55

Las células que se pueden usar, p. ej., BHK-21, HEK 293, MC57G u otras, se mantienen en cultivo y se transfectan

con el(los) plásmido(s) de complementación usando cualquiera de las estrategias comúnmente usadas, tales como protocolos basados en fosfato de calcio, en liposomas o electroporación. Unos días más tarde se añade el agente de selección adecuado, p. ej., puromicina, en concentraciones valoradas. Los clones supervivientes se aíslan y subclonan siguiendo procedimientos estándar, y los clones de células C de expresión alta se identifican mediante procedimientos de transferencia Western o de citometría de flujo con anticuerpos dirigidos contra la(s) proteína(s) viral(es) de interés. Como alternativa al uso de células C transfectadas de forma estable, la transfección transitoria de células normales puede complementar el(los) gen(es) viral(es) que faltan en cada una de las etapas donde se utilizarán células C a continuación. Además, se puede utilizar un virus auxiliar para proporcionar la funcionalidad que falta *en trans*.

Los plásmidos pueden ser de dos tipos: i) dos plásmidos, denominados plásmidos TF para expresar intracelularmente en células C los factores de acción *en trans* mínimos del arnavirus, derivan p. ej., de proteínas NP y L de LCMV en el presente ejemplo; y ii) plásmidos, denominados plásmidos GS, para expresar intracelularmente en células C los segmentos del genoma del vector de arnavirus, p. ej., los segmentos con modificaciones genomanipuladas. Los plásmidos TF expresan las proteínas NP y L del respectivo vector de arnavirus bajo el control de un casete de expresión adecuado para la expresión de proteínas en células de mamífero, típicamente p. ej., un promotor de polimerasa II de mamífero tal como el CMV o el promotor EF1alfa, cualquiera de ellos preferiblemente 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 preferiblemente con una ribozima 3'-terminal para el procesamiento del transcrito primario para producir el extremo correcto. En el caso de utilizar un sistema basado en T7, la expresión de T7 en células C debe proporcionarse incluyendo en el procedimiento de recuperación un plásmido de expresión adicional, construido de manera análoga a los plásmidos TF, siempre que T7, o las células C se construyan para expresar adicionalmente T7 de manera estable. En ciertas realizaciones, los plásmidos TF y GS pueden ser los mismos, es decir, la secuencia del genoma y los factores de acción *en trans* pueden ser transcritos por los promotores de 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, normalmente con una confluencia del 80% 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 los mismos, es decir, la secuencia del genoma y los factores de acción *en trans* pueden ser transcritos por los promotores de T7, *poll* y *pollII* de un plásmido. Para esto, se puede aprovechar cualquiera de las estrategias comúnmente utilizadas, como los protocolos basados en fosfato de calcio, en liposomas o la electroporación.

3-5 días después: se recoge el líquido sobrenadante del cultivo (preparación del vector de arnavirus), se divide en partes alícuotas y se almacena a 4°C, -20°C u -80°C, dependiendo de cuánto tiempo deba almacenarse el vector de arnavirus antes de su uso. Luego, el título infeccioso de la preparación del vector de arnavirus se evalúa mediante un ensayo de inmunoenfoque en células C. Alternativamente, las células transfectadas y el líquido sobrenadante se pueden pasar a un recipiente más grande (p. ej., un matraz de cultivo de tejidos T75) el día 3-5 después de la transfección, y el líquido sobrenadante del cultivo se recoge hasta cinco días después del pase.

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

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

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 se pueden expandir infinitamente debido a la naturaleza no citolítica de los vectores de arnavirus. Independientemente del enfoque, el antígeno posteriormente se puede recoger (y purificar) del líquido sobrenadante del cultivo o de las propias células, según las propiedades del antígeno producido. Sin embargo, la invención no se limita a estas dos estrategias, y se pueden considerar otras formas de dirigir la expresión del antígeno usando arnavirus infecciosos de replicación deficiente como vectores.

5.5.2 Generación de una partícula de arnavirus trisegmentada

Una partícula de arnavirus trisegmentada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo se puede producir de forma recombinante mediante técnicas de genética inversa conocidas en la técnica, por ejemplo, como se describe en 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 se puede modificar como se describe en la Sección 5.2.

(i) Partícula de arnavirus trisegmentada infecciosa y competente para la replicación

En ciertas realizaciones, el método para generar la partícula de arnavirus trisegmentada comprende (i) transfectar en una célula hospedante los ADNc de un segmento L y dos segmentos S; (ii) transfectar en una célula hospedante

plásmidos que expresan los factores de acción en trans mínimos NP y L del arnavirus; (iii) mantener la célula hospedante en condiciones adecuadas para la formación de virus; y (iv) recoger la partícula de arnavirus.

5 Una vez generada a partir del ADNc, la partícula de arnavirus trisegmentada (es decir, infecciosa y competente para la replicación) puede propagarse. En ciertas realizaciones, la partícula de arnavirus trisegmentada se puede propagar en cualquier célula hospedante que permita que el virus crezca hasta títulos que permitan los usos del virus como se describe en el presente documento. En una realización, la célula hospedante permite que la partícula de arnavirus trisegmentada crezca hasta títulos comparables a los determinados para el tipo natural correspondiente.

10 En determinadas realizaciones, la partícula de arnavirus trisegmentada puede propagarse en células hospedantes. Los ejemplos específicos de células hospedantes que se pueden usar incluyen BHK-21, HEK 293, VERO u otras. En una realización específica, la partícula de arnavirus trisegmentada puede propagarse en una línea celular.

En determinadas realizaciones, las células hospedantes se mantienen en cultivo y se transfectan con uno o más plásmidos. El(los) plásmido(s) expresan el(los) segmento(s) genómico(s) de arnavirus que se van a generar bajo el control de uno o más casetes de expresión adecuados para la expresión en células de mamífero, p. ej., que consisten en un promotor y terminador de la polimerasa I.

15 En realizaciones específicas, las células hospedantes se mantienen en cultivo y se transfectan con uno o más plásmidos. El(los) plásmido(s) expresan el(los) gen(es) viral(es) 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 la polimerasa I.

20 Los plásmidos que se pueden usar para generar el arnavirus trisegmentado que comprende un segmento L y dos segmentos S pueden incluir: i) dos plásmidos, cada uno de los cuales codifica el segmento genómico S p. ej., pol-I S, ii) un plásmido que codifica el segmento genómico 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, cada uno de los cuales codifica el segmento genómico L, p. ej., pol-I L, ii) un plásmido que codifica el segmento genómico S, p. ej., pol-I S.

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

30 Además, el(los) plásmido(s) presenta(n) 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 la polimerasa II como antes, o el(los) transcrito(s) del gen viral van seguidos de 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 la ampicilina.

35 La transfección de células BHK-21 con plásmido(s) se puede realizar utilizando cualquiera de las estrategias comúnmente utilizadas, tales como protocolos basados en fosfato de calcio, en liposomas o electroporación. Unos días más tarde se añade el agente de selección adecuado, por ejemplo, puromicina, en concentraciones tituladas. Los clones supervivientes se aíslan y subclonan siguiendo procedimientos estándar, y los clones de expresión alta se identifican utilizando procedimientos de transferencia Western o de citometría de flujo con anticuerpos dirigidos contra la(s) proteína(s) viral(es) de interés.

40 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 de bacteriófago T7, este último preferiblemente con un ribozima 3'-terminal para el procesamiento del transcrito primario para producir el extremo correcto. En ciertas realizaciones, los plásmidos que codifican los segmentos genómicos de arnavirus pueden ser los mismos, es decir, la secuencia del genoma y los factores de acción en trans pueden ser transcritos por los promotores de T7, polI y polII de un plásmido.

45 Para recuperar el vector de arnavirus trisegmentado, están previstos los siguientes procedimientos. Primer día: las células, típicamente con una confluencia del 80% en placas de pocillos M6, se transfectan con una mezcla de plásmidos, como se ha descrito anteriormente. Para ello, se pueden aprovechar las estrategias de uso común, tales como los protocolos basados en fosfato de calcio, en liposomas o la electroporación.

50 3-5 días después: se recoge el líquido sobrenadante cultivado (preparación del vector de arnavirus), se divide en partes alícuotas y se almacena a 4°C, -20°C u -80°C, dependiendo de cuánto tiempo deba almacenarse el vector de arnavirus antes de su uso. El título infeccioso de la preparación del vector de arnavirus se evalúa mediante un ensayo de inmunoenfoque. Alternativamente, las células transfectadas y el líquido sobrenadante se pueden pasar a un recipiente más grande (p. ej., un matraz de cultivo de tejidos T75) el día 3-5 después de la transfección, y el líquido

sobrenadante del cultivo se recoge hasta cinco días después del pase.

Ciertas realizaciones enseñan la expresión de una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo, en donde un plásmido que codifica el segmento genómico se modifica para incorporar una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo. La secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo puede incorporarse al plásmido utilizando enzimas de restricción.

(ii) Partícula de arnavirus trisegmentada infecciosa, de replicación deficiente

Las partículas de arnavirus trisegmentadas infecciosas, de replicación deficiente pueden rescatarse como se ha descrito anteriormente. Sin embargo, una vez generados a partir del ADNc, los arnavirus infecciosos, de replicación deficiente pueden propagarse en células de complementación. Las células de complementación son células que proporcionan la funcionalidad que ha sido eliminada del arnavirus de replicación deficiente por modificación de su genoma (p. ej., si el ORF que codifica la proteína GP se elimina o se inactiva funcionalmente, una célula de complementación 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 eliminación de la glicoproteína, GP), los vectores de arnavirus pueden generarse y expandirse en células que proporcionan *en trans* los genes virales eliminados, p. ej., la GP en el presente ejemplo. Dicha línea celular de complementación, denominada en lo sucesivo células C, se genera por transfección de 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 plásmido(s) para la expresión del(los) gen(es) viral(es) de interés (plásmido de complementación, denominado plásmido C). El(los) plásmido(s) C expresan el(los) gen(es) viral(es) eliminado(s) en el vector de arnavirus que se va a generar bajo el control de uno o más casetes de expresión adecuados para la expresión en células de mamífero, p. ej., un promotor de polimerasa II de mamífero tal como el promotor de CMV o EF1alfa con una señal de poliadenilación. Además, el plásmido de complementación presenta 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., casete de expresión de polimerasa II como antes, o el(los) transcrito(s) del gen viral van 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 la ampicilina.

Las células que se pueden usar, p. ej., BHK-21, HEK 293, MC57G u otras, se mantienen en cultivo y se transfectan con los plásmidos de complementación usando cualquiera de las estrategias comúnmente usadas, tales como protocolos basados en fosfato de calcio, en liposomas o electroporación. Unos días más tarde 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 de expresión alta se identifican utilizando procedimientos de transferencia Western o de citometría de flujo con anticuerpos dirigidos contra la(s) proteína(s) viral(es) de interés. Como alternativa al uso de células C transfectadas de forma estable, la transfección transitoria de células normales puede complementar el(los) gen(es) viral(es) que faltan en cada una de las etapas donde se utilizarán células C a continuación. Además, se puede utilizar un virus auxiliar para proporcionar la funcionalidad que falta *en trans*.

Se pueden usar plásmidos de dos tipos: i) dos plásmidos, denominados plásmidos TF para expresar intracelularmente en células C los factores mínimos de acción *in trans* del arnavirus, derivados de, p. ej., proteínas NP y L del LCMV en el presente ejemplo; y ii) plásmidos, denominados plásmidos GS, para expresar intracelularmente en células C los segmentos del genoma del vector de arnavirus, p. ej., los segmentos con modificaciones genomanipuladas. Los plásmidos TF expresan las proteínas NP y L del respectivo vector de arnavirus bajo el control de un casete de expresión adecuado para la expresión de proteínas en células de mamífero, típicamente p. ej., un promotor de la polimerasa II de mamífero tal como el promotor de CMV o EF1alfa, cualquiera de ellos preferiblemente 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 preferiblemente con una ribozima 3'-terminal para procesar el transcrito primario para producir el extremo correcto. En el caso de utilizar un sistema basado en T7, la expresión de T7 en células C debe proporcionarse mediante la inclusión en el procedimiento de recuperación de un plásmido de expresión adicional, construido de manera análoga a los plásmidos TF, siempre que T7, o las células C se construyan para expresar adicionalmente T7 de manera estable. En ciertas realizaciones, los plásmidos TF y GS pueden ser los mismos, es decir, la secuencia del genoma y los factores de acción *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, normalmente con una confluencia del 80% 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 los mismos, es decir, la secuencia del genoma y los factores de acción *in trans* pueden ser transcritos por los promotores T7, *poll* y *pollII* de un plásmido. Para esto, se puede explotar cualquiera de las estrategias comúnmente utilizadas, tales como los protocolos basados en fosfato de calcio, en liposomas o la electroporación.

3-5 días después: se recoge el líquido sobrenadante del cultivo (preparación del vector de arnavirus), se divide en partes alícuotas y se almacena a 4°C, -20°C u -80°C, dependiendo de cuánto tiempo deba almacenarse el vector de arnavirus antes de su uso. Luego, el título infeccioso de la preparación del vector de arnavirus se evalúa mediante un ensayo de inmunoenfoque en células C. Alternativamente, las células transfectadas y el líquido sobrenadante se pueden pasar a un recipiente más grande (p. ej., un matraz de cultivo de tejidos T75) el día 3-5 después de la transfección, y el líquido sobrenadante del cultivo se recoge hasta cinco días después del pase.

En el presente documento se describe la expresión de un antígeno en un cultivo celular en donde el cultivo celular se infecta con un arnavirus trisegmentado infeccioso, de replicación deficiente, que expresa un antígeno. Cuando se usa para la expresión de un antígeno en células cultivadas, se pueden usar los dos procedimientos siguientes:

i) El tipo de célula de interés se infecta con la preparación de vector de arnavirus descrita en el presente documento con una multiplicidad de infección (MOI) de uno o más, p. ej., dos, tres o cuatro, lo que da como resultado la producción del antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo en todas las células ya poco tiempo después de la infección.

ii) Alternativamente, se puede usar una MOI más baja y se pueden seleccionar clones de células individuales por su nivel de expresión dirigida por virus de un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo. Posteriormente, los clones individuales se pueden expandir infinitamente debido a la naturaleza no citolítica de los vectores de arnavirus. Independientemente del enfoque, el antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo posteriormente se puede recoger (y purificar) del líquido sobrenadante del cultivo o de las propias células, dependiendo de las propiedades del antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico producido. Sin embargo, la invención no se limita a estas dos estrategias, y se pueden considerar otras formas de dirigir la expresión del antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo usando arnavirus infecciosos de replicación deficiente como vectores.

5.6 Generación de arnavirus infecciosos, de replicación deficiente que expresan un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo

En general, las partículas de arnavirus se pueden producir de forma recombinante mediante técnicas de genética inversa estándar como se describe para el LCMV (L. Flatz, A. Bergthaler, J. C. de la Torre y D. D. Pinschewer, *Proc Natl Acad Sci USA* 103:4663-4668, 2006; A. B. Sanchez y J. C. de la Torre, *Virology* 350:370, 2006; E. Ortiz-Riano, B.Y. Cheng, J. C. de la Torre, L. Martínez-Sobrido. *J Gen Virol.* 94:1175-88, 2013). Para generar arnavirus infecciosos de replicación deficiente para usar con la presente invención, se pueden usar estas técnicas, sin embargo, el genoma del virus rescatado se modifica como se describe en el presente documento. Estas modificaciones pueden ser: i) uno o más, por ejemplo, dos, tres o cuatro, de los cuatro ORF de arnavirus (glicoproteína (GP); nucleoproteína (NP); la proteína de matriz Z; la ARN polimerasa L dependiente de ARN) se eliminan o inactivan funcionalmente para evitar la formación de partículas infecciosas en células normales, aunque permitiendo todavía la expresión génica en células hospedantes infectadas con vector de arnavirus; y ii) se pueden introducir nucleótidos que codifican un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo. Los virus infecciosos, de replicación deficiente, como se describe en el presente documento, se pueden producir como se describe en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional N.º WO 2009/083210 (número de solicitud PCT/EP2008/010994) y la Publicación de Solicitud de Patente Internacional N.º WO 2014/140301 (número de solicitud PCT/EP2014/055144).

Una vez generados a partir del ADNc, los arnavirus infecciosos de replicación deficiente pueden propagarse en células de complementación. Las células de complementación son células que proporcionan la funcionalidad que se ha eliminado del arnavirus de replicación deficiente mediante la modificación de su genoma (p. ej., si el ORF que codifica la proteína GP se elimina o se inactiva funcionalmente, una célula de complementación proporciona la proteína GP).

Debido a la eliminación o inactivación funcional de uno o más de los genes virales en vectores de arnavirus (aquí se tomará como ejemplo la eliminación de la glicoproteína, GP), los vectores de arnavirus pueden generarse y expandirse en células proporcionando en trans el(los) gen(es) viral(es) eliminado, p. ej., la GP en el presente ejemplo. Dicha línea celular de complementación, denominada en lo sucesivo células C, se genera mediante la transfección de 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 plásmido(s) para la expresión del(los) gen(es) viral(es) de interés (plásmido de complementación, denominado plásmido C). El(los) plásmido(s) C expresan el(los) gen(es) viral(es) eliminados 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 mamífero. p. ej., un promotor de polimerasa II de mamífero tal como el promotor de CMV o EF1 alfa con una señal de poliadenilación. Además, el plásmido de complementación presenta un marcador de selección de mamífero, p. ej., resistencia a la puomicina, bajo el control de un casete de expresión adecuado para la expresión génica en células de mamífero, p. ej., casete de expresión de polimerasa II como antes, o el(los) gen(es) viral(es) transcritos van 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 la 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(los) plásmido(s) de complementación usando cualquiera de las estrategias comúnmente usadas, tales como

protocolos basados en fosfato de calcio, en liposomas o electroporación. Unos días más tarde 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 de expresión alta se identifican por procedimientos de transferencia Western o de citometría de flujo con anticuerpos dirigidos contra la(s) proteína(s) viral(es) de interés.

5 Como alternativa al uso de células C transfectadas de forma estable, la transfección transitoria de células normales puede complementar el(los) gen(es) viral(es) que faltan en cada una de las etapas en las que se van a usar células C a continuación. Además, se puede utilizar un virus auxiliar para proporcionar la funcionalidad que falta en trans.

Los plásmidos que se pueden usar pueden ser de dos tipos: i) dos plásmidos, denominados plásmidos TF para expresar intracelularmente en células C los factores mínimos de acción en trans del arnavirus, p. ej., proteínas NP y L del 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 genomanipuladas. Los plásmidos TF expresan las proteínas NP y L del respectivo vector de arnavirus 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 de CMV o EF1alfa, cualquiera de ellos preferiblemente 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 preferiblemente con una ribozima 3'-terminal para procesar el transcrito primario para dar el extremo correcto. En el caso de utilizar un sistema basado en T7, la expresión de T7 en células C debe proporcionarse mediante la inclusión en el procedimiento de recuperación de un plásmido de expresión adicional, construido de manera análoga a los plásmidos TF, siempre que T7, o las células C se construyan para expresar adicionalmente T7 de manera estable. En ciertas realizaciones, los plásmidos TF y GS pueden ser los mismos, es decir la secuencia del genoma y los factores de acción en trans pueden ser transcritos por los promotores T7, poll y pollI de un plásmido.

Para la recuperación del vector de arnavirus, se pueden usar los siguientes procedimientos. Primer día: las células C, normalmente con una confluencia del 80% 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 los mismos, es decir la secuencia del genoma y los factores de acción en trans pueden ser transcritos por los promotores T7, poll y pollI de un plásmido. Para esto, se puede explotar cualquiera de las estrategias comúnmente utilizadas, tales como los protocolos basados en fosfato de calcio, en liposomas o electroporación.

30 3-5 días después: se recoge el líquido sobrenadante del cultivo (preparación del vector de arnavirus), se divide en partes alícuotas y se almacena a 4°C, -20°C u -80°C, dependiendo de cuánto tiempo deba almacenarse el vector de arnavirus antes de su uso. Luego, el título infeccioso de la preparación del vector de arnavirus se evalúa mediante un ensayo de inmunoensayo en células C.

En el presente documento se describe la expresión de un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo en un cultivo celular en donde el cultivo celular se infecta con un arnavirus infeccioso bisegmentado de replicación deficiente que expresa un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo. Cuando se usa para la expresión de un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo en células cultivadas, se pueden usar los dos procedimientos siguientes:

40 i) El tipo de célula de interés se infecta con la preparación de vector de arnavirus descrita en el presente documento con una multiplicidad de infección (MOI) de uno o más, p. ej., dos, tres o cuatro, lo que da como resultado la producción del antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo en todas las células ya poco tiempo después de la infección.

45 ii) Alternativamente, se puede usar una MOI más baja y se pueden seleccionar clones de células individuales por su nivel de expresión dirigida por virus de un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo. Posteriormente, los clones individuales se pueden expandir infinitamente debido a la naturaleza no citolítica de los vectores de arnavirus. Independientemente del enfoque, el antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo posteriormente se puede recoger (y purificar) del líquido sobrenadante del cultivo o de las propias células, dependiendo de las propiedades del antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo producido. Sin embargo, la invención no se limita a estas dos estrategias, y se pueden considerar otras formas de dirigir la expresión de un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo usando arnavirus infecciosos de replicación deficiente como vectores.

Alternativamente, se puede usar un sistema de rescate que consiste en tres plásmidos: (1) el primer plásmido expresa la proteína NP por transcripción a través de la polimerasa II y posterior traducción en células transfectadas; (2) el segundo plásmido da lugar al segmento L (de cadena negativa) del genoma del LCMV por transcripción a través de la polimerasa I, así como a la proteína L por transcripción a través de la polimerasa II del mismo molde en la dirección opuesta al promotor de la polimerasa I; (3) el tercer plásmido da lugar al segmento S del genoma del LCMV (que codifica la secuencia codificante del antígeno en lugar de la glicoproteína del LCMV) a través de la transcripción por la polimerasa I. Se utilizan 3 µg de cada plásmido para la electroporación de las células C, seguido de siembra de células en placas de 6 pocillos e incubación a 37°C. Después de la incubación, las células y el líquido sobrenadante de las transfecciones se combinan con células C recién sembradas, y se recogen los vectores y se limpian de células

y desechos en un punto de tiempo definido después de la infección. Una vez que se ha generado el vector, se puede insertar un ácido nucleico que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo en un plásmido a partir del cual se transcribe un segmento genómico de un vector infeccioso de replicación deficiente mediante cualquier técnica conocida por los expertos.

- 5 Debido a la eliminación o inactivación funcional de uno o más de los genes virales en vectores de arnavirus (aquí se tomará como ejemplo la eliminación de la glicoproteína, GP), los vectores de arnavirus pueden generarse y expandirse en células que proporcionan el(los) gen(es) viral(es) eliminados o funcionalmente inactivados (p. ej., la GP) *en trans*. El virus resultante en sí mismo es infeccioso, pero no puede producir más partículas de progenie infecciosas en células que no son de complementación debido a la falta del(los) gen(es) viral(es) eliminados o funcionalmente inactivados (p. ej., la GP). La célula de complementación puede proporcionar la funcionalidad que falta ya sea por transfección estable, transfección transitoria o por infección con un virus auxiliar que exprese la funcionalidad que falta.

10 En ciertos casos, la célula de complementación proporciona el gen viral que se ha eliminado o inactivado funcionalmente del genoma del vector de arnavirus. En un caso específico, la célula de complementación proporciona el gen viral de una cepa viral que es la misma que la cepa viral que se utilizó para generar el genoma del vector de arnavirus. En otro caso, la célula de complementación proporciona el gen viral de una cepa viral diferente de la cepa viral que se utilizó para generar el genoma del vector de arnavirus. Por ejemplo, el gen viral proporcionado en la célula de complementación se obtiene de la cepa MP del LCMV. En otro ejemplo, el gen viral proporcionado en la célula de complementación se obtiene de la cepa WE del LCMV.

15 En un caso específico, la célula de complementación proporciona la GP de la cepa MP del LCMV y el vector de arnavirus comprende un ORF de un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo, en lugar del ORF que codifica la proteína GP. En un caso aún más específico, la célula de complementación proporciona la GP de la cepa MP del LCMV y el vector de arnavirus se obtiene del Clon 13 del LCMV y comprende un ORF de un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo como se describe en el presente documento en lugar del ORF que codifica la proteína GP.

20 En un caso específico, la célula de complementación proporciona la GP de la cepa Clon 13 del LCMV y el vector de arnavirus comprende un ORF de un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo en lugar del ORF que codifica la proteína GP. En un caso aún más específico, la célula de complementación proporciona la GP de la cepa Clon 13 del LCMV y el vector de arnavirus se obtiene de la cepa MP del LCMV y comprende un ORF de un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo en lugar del ORF que codifica la proteína GP.

25 En un caso específico, la célula de complementación proporciona la GP de la cepa WE del LCMV y el vector de arnavirus comprende un ORF de un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo en lugar del ORF que codifica la proteína GP. En un caso aún más específico, la célula de complementación proporciona la GP de la cepa WE del LCMV y el vector de arnavirus se obtiene del Clon 13 del LCMV y comprende un ORF de un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo en lugar del ORF que codifica la proteína GP.

30 En un caso específico, la célula de complementación proporciona la GP de la cepa WE del LCMV y el vector de arnavirus comprende un ORF de un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo en lugar del ORF que codifica la proteína GP. En un caso aún más específico, la célula de complementación proporciona la GP de la cepa WE del LCMV y el vector de arnavirus se obtiene de la cepa MP del LCMV y comprende un ORF de un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo en lugar del ORF que codifica la proteína GP.

5.7 Ácidos nucleicos, sistemas de vectores y líneas celulares

35 En ciertos casos, los ADNc comprenden o consisten en el segmento genómico de arnavirus o la partícula de arnavirus trisegmentada

5.7.1 Marco de lectura abierto en posición no natural

40 En una realización, los ácidos nucleicos codifican un segmento genómico de arnavirus como se describe en la sección 5.1. En realizaciones más específicas, en la Tabla 1 se exponen una secuencia de nucleótidos de ADN o un conjunto de secuencias de nucleótidos de ADN. Las células hospedantes que comprenden dichos ácidos nucleicos también se describen en la sección 5.1.

45 En realizaciones específicas, un ADNc del segmento genómico de arnavirus está genomanipulado para llevar un ORF en una posición diferente de la posición natural del ORF y una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo, en donde el segmento genómico de arnavirus codifica un ORF heterólogo como se describe en la sección 5.1

55 En una realización, un sistema de vectores de expresión de ADN codifica el segmento genómico de arnavirus

genomanipulado para llevar un ORF en una posición diferente de la posición natural del ORF y una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo. En una realización específica, uno o más vectores de un sistema de vectores de expresión de ADN codifican dos segmentos genómicos de arnavirus, en concreto, un segmento L y un segmento S, de una partícula de arnavirus. Dicho sistema de vectores puede codificar una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo.

En otra realización, un ADNc del segmento S de arnavirus se ha genomanipulado para llevar un ORF en una posición diferente de la posición natural y una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo es parte de o está incorporado en un sistema de expresión de ADN. En otras realizaciones, un ADNc del segmento L de arnavirus se ha genomanipulado para llevar un ORF en una posición distinta de la posición natural y una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo es parte de o está incorporado en un sistema de expresión de ADN. En determinadas realizaciones, el ADNc del segmento genómico de arnavirus se ha genomanipulado para llevar (i) un ORF en una posición distinta de la posición natural del ORF; y (ii) el ORF que codifica la GP, NP, proteína Z o proteína L se ha eliminado y reemplazado por una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo.

En ciertas realizaciones, el ADNc puede derivar de una cepa particular del LCMV. Las cepas de LCMV incluyen Clon 13, cepa MP, Arm CA 1371, Arm E-250, WE, UBC, Traub, Pasteur, 810885, CH-5692, Marseille nº12, HP65-2009, 200501927, 810362, 811316, 810316, 810366, 20112714, Douglas, GR01, SN05, CABN y sus derivados. En realizaciones específicas, el ADNc deriva del Clon 13 del LCMV. En otras realizaciones específicas, el ADNc deriva de la cepa MP del LCMV.

En ciertas realizaciones, el vector generado para codificar una partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada 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 nº12, HP65-2009, 200501927, 810362, 811316, 810316, 810366, 20112714, Douglas, GR01, SN05, CABN y sus derivados. En determinadas realizaciones, una partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada puede basarse en el Clon 13 del LCMV. En otras realizaciones, el vector generado para codificar una partícula de arnavirus o una partícula de arnavirus trisegmentada puede basarse en la cepa MP del LCMV.

En otra realización, una célula comprende un ADNc o un sistema de vectores en el contexto de la invención. Las líneas celulares derivadas de dichas células, los cultivos que comprenden dichas células, los métodos para cultivar dichas células también se describen en el presente documento. En determinadas realizaciones, una célula comprende un ADNc del segmento genómico de arnavirus que se ha genomanipulado para llevar un ORF en una posición distinta de la posición natural del ORF y una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo. En algunas realizaciones, la célula comprende el segmento S y/o el segmento L.

5.7.2 Partícula de arnavirus trisegmentada

En una realización, los ácidos nucleicos codifican una partícula de arnavirus trisegmentada en el contexto de la invención. En realizaciones más específicas, una secuencia de nucleótidos de ADN o un conjunto de secuencias de nucleótidos de ADN, por ejemplo, se expone en la Tabla 2 o la Tabla 3. Las células hospedantes que comprenden dichos ácidos nucleicos también se describen en la sección 5.2.

En realizaciones específicas, un ADNc de la partícula de arnavirus trisegmentada se ha genomanipulado para llevar un ORF en una posición distinta de la posición natural del ORF. En otras realizaciones, un ADNc de la partícula de arnavirus trisegmentada se ha genomanipulado para (i) llevar un ORF de arnavirus en una posición distinta de la posición natural del ORF; y (ii) codificar un ORF heterólogo como se describe en la sección 5.2.

En una realización, un sistema de vectores de expresión de ADN codifica conjuntamente la partícula de arnavirus trisegmentada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo. Específicamente, en el contexto de la invención, un sistema de vectores de expresión de ADN comprende uno o más vectores que codifican tres segmentos genómicos de arnavirus, en concreto, un segmento L y dos segmentos S de una partícula de arnavirus trisegmentada. Dicho sistema de vectores puede codificar un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo.

En otra realización, un ADNc del(los) segmento(s) S de arnavirus se ha genomanipulado para llevar un ORF en una posición distinta de la posición natural y una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo que es parte o se incorpora en un sistema de expresión de ADN. En otras realizaciones, un ADNc del(los) segmento(s) L de arnavirus se ha genomanipulado para llevar un ORF en una posición distinta de la posición natural y una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo que es parte o se incorpora en un sistema de expresión de ADN. En ciertas realizaciones, un ADNc de la partícula de arnavirus trisegmentada se ha genomanipulado para llevar (i) un ORF en una posición distinta de la posición natural del ORF; y (ii) se ha eliminado un ORF que codifica la GP, NP, proteína Z o proteína L y se ha reemplazado por una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral,

antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo.

5 En ciertas realizaciones, el ADNc puede derivar de una cepa particular de LCMV. Las cepas del LCMV incluyen Clon 13, cepa MP, Arm CA 1371, Arm E-250, WE, UBC, Traub, Pasteur, 810885, CH-5692, Marseille nº12, HP65-2009, 200501927, 810362, 811316, 810316, 810366, 20112714, Douglas, GR01, SN05, CABN y sus derivados. En realizaciones específicas, el ADNc deriva del Clon 13 del LCMV. En otras realizaciones específicas, el ADNc deriva de la cepa MP del LCMV.

10 En ciertas realizaciones, el vector generado para codificar una partícula de arenavirus o una partícula de arenavirus trisegmentada puede basarse en una cepa específica de LCMV. Las cepas del LCMV incluyen Clon 13, cepa MP, Arm CA 1371, Arm E-250, WE, UBC, Traub, Pasteur, 810885, CH-5692, Marseille nº12, HP65-2009, 200501927, 810362, 811316, 810316, 20112714, Douglas, GR01, SN05, CABN y sus derivados. En determinadas realizaciones, una partícula de arenavirus o una partícula de arenavirus trisegmentada puede basarse en el Clon 13 del LCMV. En otras realizaciones, el vector generado para codificar una partícula de arenavirus o una partícula de arenavirus trisegmentada puede basarse en la cepa MP del LCMV.

15 Una célula puede comprender un ADNc o un sistema de vectores descrito anteriormente en esta sección. También se describen en el presente documento líneas celulares derivadas de tales células, cultivos que comprenden tales células, métodos para cultivar tales células infectadas. Una célula puede comprender un ADNc de la partícula de arenavirus trisegmentada. En algunos casos, la celda puede comprender el segmento S y/o el segmento L.

5.7.3 Arenavirus de replicación deficiente

20 En el presente documento se describe una secuencia de ácido nucleico que es el ADNc del segmento genómico grande (segmento L) de un arenavirus bisegmentado infeccioso de replicación deficiente, en el que un ORF del segmento genómico se elimina o se inactiva funcionalmente, y el segmento genómico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo.

25 En el presente documento se describe una secuencia de ácido nucleico que codifica el segmento genómico corto (segmento S) de un arenavirus bisegmentado infeccioso de replicación deficiente, en el que un ORF del segmento genómico se elimina o se inactiva funcionalmente y en donde el segmento genómico corto comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo. En el presente documento se describe una secuencia de ácido nucleico que codifica el segmento genómico corto (segmento S) de un arenavirus bisegmentado infeccioso de replicación deficiente descrito en el presente documento, en el que el ORF del gen de la glicoproteína se elimina o inactiva funcionalmente y en donde el segmento genómico corto comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo. En ciertos casos más específicos, el antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo, es un antígeno descrito en la sección 5.4.

35 En ciertos casos, las secuencias de ácido nucleico pueden derivar 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 nº12, HP65-2009, 200501927, 810362, 811316, 810316, 810366, 20112714, Douglas, GR01, SN05, CABN y sus derivados. En casos específicos, el ácido nucleico deriva del Clon 13 del LCMV. En otros casos específicos, el ácido nucleico deriva de la cepa MP del LCMV.

En un caso más específico, un ácido nucleico comprende un segmento genómico de arenavirus; y (ii) una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo.

40 En un caso, un sistema de vectores comprende uno o más vectores que juntos comprenden el genoma de una partícula de arenavirus bisegmentada infecciosa, de replicación deficiente. En el presente documento se describe un sistema de vectores en donde uno o más vectores comprenden dos segmentos genómicos de arenavirus, en concreto, un segmento L y un segmento S, de un arenavirus bisegmentado infeccioso, de replicación deficiente descrito en el presente documento. Dicho sistema de vectores puede comprender (en una o más moléculas de ADN separadas):

45 - Un segmento genómico S de arenavirus que se modifica de tal manera que una partícula de arenavirus que lleva este segmento genómico S modificado no puede producir partículas de virus de progenie infecciosas y un segmento genómico L de arenavirus que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica (en paralelo o antiparalelo) un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo;

50 - Un segmento genómico L de arenavirus que se modifica de tal manera que una partícula de arenavirus que lleva este segmento genómico L modificado no puede producir partículas de virus de progenie infecciosas y un segmento genómico S de arenavirus que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica (en paralelo o antiparalelo) un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo;

55 - Un segmento genómico S de arenavirus que se modifica de tal manera que una partícula de arenavirus que lleva este segmento genómico S modificado no puede producir partículas de virus de progenie infecciosas y en donde el segmento genómico S de arenavirus comprende una secuencia de nucleótidos que codifica (en paralelo o antiparalelo) un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo y que comprende un segmento

genómico L de arnavirus de tipo natural; o

- 5 - Un segmento genómico L de arnavirus que se modifica de tal manera que una partícula de arnavirus que lleva este segmento genómico L modificado no puede producir partículas de virus de progenie infecciosas y en donde el segmento genómico L de arnavirus comprende una secuencia de nucleótidos que codifica (en paralelo o antiparalelo) un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo y que comprende un segmento genómico S de arnavirus de tipo natural.

En el presente documento se describe una secuencia de ácido nucleico que comprende un segmento genómico de arnavirus (p. ej., LCMV) en el que el ORF que codifica la GP del segmento genómico S puede sustituirse por una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo, que se selecciona del grupo que consiste en antígenos virales oncogénicos, antígenos de cáncer de testículo, antígenos oncofetales, antígenos de diferenciación tisular, antígenos de proteínas mutantes, neoantígenos, adipofilina, AIM-2, ALDH1A1, BCLX (L), BING-4, CALCA, CD45, CPSF, ciclina D1, DKKI, ENAH (hMcna), Ga733 (EpCAM), EphA3, EZH2, FGF5, glipican-3, G250 /MN/CAIX, HER-2/neu, IDO1, IGF2B3, IL13Ralpha2, carboxil esterasa intestinal, alfa-fetoproteína, calicreína 4, KIF20A, Lengsin, M-CSF, MCSP, mdm-2, Meloe, MMP-2, MMP-7, MUC1, MUC5AC, p53 (no mutante), PAX5, PBF, PRAME, PSMA, RAGE, RAGE-1, RGS5, RhoC, RNF43, RU2AS, secernina 1, SOX10, STEAP1 (antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de la próstata 1), survivina, telomerasa, VEGF, WT1, EGF-R, CEA, CD20, CD33, CD52, glicoproteína 100 (proteína GP100 o gp 100), MELANA/MART1, MART2, NY-ESO-1, p53, MAGE A1, MAGE A3, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, CDK4, alfa-actinina-4, ARTC1, BCR-ABL, 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, ETV6-AML, proteína de fusión ETV6-AML1, FLT3-ITD, FN1, GPNMB, proteína de fusión LDLR-fucosiltransferasaAS, NFYC, OGT, OS-9, proteína de fusión pml-RARalpha, PRDX5, PTPRK, H-ras, K-ras (oncogén viral del sarcoma de rata V-Ki-ras2 Kirsten), N-ras, RBAF600, SIRT2, SNRPD1, SSX, SSX2, proteína de fusión SYT-SSX1 o -SSX2, TGF-betaRII, triosafosfato isomerasa, ormdm-2, LMP2, HPV E6/E7, EGFRvIII (variante III del factor de crecimiento epidérmico), Idiotipo, GD2, gangliósido G2), mutante Ras, p53 (mutante), proteinasa 3 (PR1), tirosinasa, PSA, hTERT, puntos de corte de translocación de sarcoma, EphA2, fosfatasa ácida prostática PAP, neo-PAP, ML-IAP, AFP, ERG (gen de fusión TMPRSS2 ETS), NA17, PAX3, ALK, receptor de andrógenos, ciclina B1, ácido polisiálico, MYCN, TRP2, TRP2-Int2, GD3, Fucosil GM1, mesotelina, PSCA, sLe(a), cyp1B1, PLAC1, GM3, BORIS, Tn, GLoboH, NY-BR-1, SART3, STn, anhidrasa carbónica IX, OY-TE51, proteína espermática 17, LCK, antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMWMAA), AKAP-4, SSX2, XAGE 1, B7H3, Legumina, Tie 2, Page4, VEGFR2, MAD-CT-1, FAP, PDGFR-beta, MAD-CT-2, antígeno 1 asociado con For, TRP1, CA-125, CA19-9, calretinina, antígeno de membrana epitelial (EMA), antígeno tumoral epitelial (ETA), CD19, CD34, CD99, CD117, cromogranina, citoqueratina, desmina, proteína ácida fibrilar glial (GFAP), proteína del líquido de la enfermedad quística macroscópica (GCDFP-15), antígeno HMB-45, Myo-D1, actina específica del músculo (MSA), neurofilamento, enolasa específica de neurona (NSE), fosfatasa alcalina placentaria, sinaptofisina, tiroglobulina, factor de transcripción tiroidea 1, forma dimérica de la isoenzima piruvato quinasa tipo M2 (tumor M2-PK), BAGE BAGE-1, CAGE, CTAGE, FATE, GAGE, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, HCA661, HOM-TE5-85, MAGEA, MAGEB, MAGEC, NA88, NY-SAR-35, SPANXB1, SPA17, SSX, SYCP1, TPTE, carbohidrato/gangliósido GM2 (antígeno oncofetal-inmunogénico-1 OFA-I-1), GM3, CA 15-3 (CA 27.29/BCAA), CA 195, CA 242, CA 50, CAM 43, CEA, EBNA, EF2, antígeno del virus de Epstein-Barr, HLA-A2, HLA-A11, HSP70-2, KIAA0205, MUM-1, MUM-2, MUM-3, miosina clase I, GnTV, Herv -K-mel, LAGE-1, LAGE-2, (proteína espermática) SP17, SCP-1, P15(58), Hom/Mel-40, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR, TSP-180, P185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23H1, TAG-72, TAG-72-4, CA-72-4, CAM 17.1, NuMa, 13-catenina, P16, TAGE, CT7, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, 13HCG, BCA225, BTAA, CD68/KP1, CO-029, HTgp-175, M344, MG7-Ag, MOV18, NB170K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90, TAAL6, TLP, TPS, CD22, CD27, CD30, CD70, prosteina, TARP (proteína del marco de lectura alternativo gamma del receptor de células T), Trp-p8, integrina avβ3 (CD61), galactina o Ral-B, CD123, CLL-1, CD38, CS-1, CD138 y ROR1.

En el presente documento se describe una secuencia de ácido nucleico que comprende un segmento genómico de arnavirus (p. ej., LCMV) en el que el ORF que codifica la GP del segmento genómico S puede sustituirse por una secuencia de nucleótidos que codifica uno o más antígenos tumorales, antígenos asociados a tumores o fragmentos antigénicos de los mismos (p. ej., uno o más de los enumerados en el párrafo anterior).

En el presente documento se describe una célula en donde la célula comprende un ácido nucleico o un sistema de vectores descrito anteriormente en esta sección. También se describen en el presente documento líneas celulares derivadas de tales células, cultivos que comprenden tales células y métodos para cultivar tales células infectadas con ácidos nucleicos o sistemas de vectores. En el presente documento se describe una célula en donde la célula comprende un ácido nucleico que comprende el segmento genómico grande (segmento L) de un arnavirus bisegmentado infeccioso, de replicación deficiente descrito en el presente documento, en el que un ORF del segmento genómico se elimina o se inactiva funcionalmente, y el segmento genómico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo.

En el presente documento se describe una célula en donde la célula comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende el segmento genómico corto (segmento S) de un arnavirus bisegmentado infeccioso, de replicación deficiente descrito en el presente documento, en el que un ORF del segmento genómico se elimina o se inactiva funcionalmente, y en donde el segmento genómico corto comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un

antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo.

En el presente documento se describe una célula en donde la célula comprende dos ácidos nucleicos o sistemas de vectores. También se describen líneas celulares derivadas de dichas células, cultivos que comprenden dichas células y métodos para cultivar dichas células infectadas con ácidos nucleicos o sistemas de vectores.

5 5.8 Métodos de uso

Las vacunas han tenido éxito para prevenir y/o tratar enfermedades infecciosas, tales como las del virus de la poliomielitis y el sarampión. Sin embargo, la inmunización terapéutica en el contexto de enfermedades crónicas establecidas, incluido el cáncer, ha tenido menos éxito. La capacidad de generar una partícula de arnavirus que se usa en combinación con un inhibidor de punto de control inmunitario representa una nueva estrategia de vacuna novedosa.

10 En determinadas realizaciones, en el presente documento se proporciona una partícula de arnavirus trisegmentada para usar en métodos para tratar una enfermedad neoplásica en un sujeto. Dichos métodos pueden incluir la administración a un sujeto que lo necesite de una partícula de arnavirus y un inhibidor de punto de control inmunitario. La partícula de arnavirus para usar según la invención es una partícula de arnavirus trisegmentada, incluyendo una partícula de arnavirus trisegmentada infecciosa, de replicación deficiente o una partícula de arnavirus trisegmentada competente para la replicación. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, una partícula de arnavirus trisegmentada, para usar según la invención, es de replicación deficiente, en donde la partícula de arnavirus está genomanipulada para contener un genoma que comprende: (1) una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo; y (2) la capacidad de amplificar y expresar su información genética en células infectadas pero incapaz de producir más partículas de progenie infecciosas en células que no son de complementación. Además, en determinadas realizaciones, una partícula de arnavirus trisegmentada para usar según la invención es competente para la replicación, en donde la partícula de arnavirus trisegmentada está genomanipulada para contener un genoma que comprende: (1) una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, tumor antígeno asociado o un fragmento antigénico del mismo; (2) la capacidad de amplificar y expresar su información genética en células infectadas; y (3) la capacidad de producir más partículas de progenie infecciosas en células normales, no modificadas genéticamente. En ciertos casos, la partícula de arnavirus utilizada en los métodos es una partícula de arnavirus bisegmentada infecciosa, de replicación deficiente. Por lo tanto, en ciertos casos, la partícula de arnavirus infecciosa de replicación deficiente utilizada en los métodos está genomanipulada para contener un genoma que comprende: (1) una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo; y (2) la capacidad de amplificar y expresar su información genética en células infectadas pero incapaz de producir más partículas de progenie infecciosas en células que no son de complementación. En ciertas realizaciones, el inhibidor de punto de control inmunitario inhibe, disminuye o interfiere con la actividad de un regulador negativo de punto de control.

35 En una realización, los métodos para tratar una enfermedad neoplásica en un sujeto comprenden administrar al sujeto una o más partículas de arnavirus que expresan un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo o una composición del mismo, y un inhibidor de punto de control inmunitario. En una realización específica, un método para tratar una enfermedad neoplásica comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más partículas de arnavirus que expresan un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo o una composición del mismo, y un inhibidor de punto de control inmunitario. El sujeto puede ser un mamífero, tal como, pero no limitado a un ser humano, un ratón, una rata, un cobayo, un animal doméstico, 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.

45 En otra realización, los métodos para inducir una respuesta inmunitaria contra una célula o tejido neoplásico, tal como una célula cancerosa o tumor, en un sujeto comprenden administrar al sujeto una partícula de arnavirus que expresa un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo, o una composición del mismo, y un inhibidor del punto de control inmunitario.

En otra realización, los sujetos a los que se administra una partícula de arnavirus que expresa un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo, o una composición del mismo, y un inhibidor de punto de control inmunitario tienen, son susceptibles o corren el riesgo de padecer una enfermedad neoplásica.

50 En otra realización, los sujetos a los que se administra una partícula de arnavirus que expresa un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo, o una composición del mismo, y un inhibidor de punto de control inmunitario tienen, son susceptibles o corren el riesgo de desarrollar una enfermedad neoplásica, tal como el cáncer, o presentar una lesión tisular precancerosa. En otra realización específica, a los sujetos a los que se les administra una partícula de arnavirus que expresa un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo, o una composición del mismo, y un inhibidor de punto de control inmunitario se les diagnostica una enfermedad neoplásica, tal como cáncer, o presentan una lesión tisular precancerosa.

En otra realización, los sujetos a los que se les administra una partícula de arnavirus que expresa un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo, o una composición del mismo, y un inhibidor de punto de control inmunitario padecen, son susceptibles o corren el riesgo de padecer, una enfermedad neoplásica

seleccionada de, pero no limitada a leucemia linfoblástica aguda; linfoma linfoblástico agudo; leucemia linfocítica aguda; leucemia mielógena aguda; leucemia mielóide aguda (adulto/infancia); carcinoma corticosuprarrenal; cánceres relacionados con el SIDA; linfoma relacionado con el SIDA; cáncer anal; cáncer de apéndice; astrocitomas; tumor teratoideo/rabdóideo atípico; carcinoma de células basales; cáncer de las vías biliares, extrahepático (colangiocarcinoma); cáncer de vejiga; osteosarcoma óseo/histiocitoma fibroso maligno; cáncer cerebral (adulto/infantil); tumor cerebral, astrocitoma cerebeloso (adulto/infancia); tumor cerebral, astrocitoma cerebral/tumor cerebral glioma maligno; tumor cerebral, ependimoma; tumor cerebral, meduloblastoma; tumor cerebral, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales; tumor cerebral, glioma de la vía óptica e hipotalámico; glioma del tronco encefálico; cáncer de mama; adenomas/carcinoides bronquiales; tumor bronquial; linfoma de Burkitt; cáncer en la infancia; tumor gastrointestinal carcinoide; tumor carcinoide; carcinoma del adulto, sitio primario desconocido; carcinoma de origen primario desconocido; tumor embrionario del sistema nervioso central; linfoma del sistema nervioso central, primario; cáncer de cuello uterino; carcinoma corticosuprarrenal infantil; cánceres infantiles; astrocitoma cerebral infantil; cordoma, infancia; leucemia linfocítica crónica; leucemia mielógena crónica; leucemia mielóide crónica; trastornos mieloproliferativos crónicos; cáncer de colon; cáncer colorrectal; craneofaringioma; linfoma cutáneo de células T; tumor desmoplásico de células redondas pequeñas; enfisema; cáncer endometrial; ependimoblastoma; ependimoma; cáncer de esófago; el sarcoma de Ewing en la familia de tumores de Ewing; tumor extracraneal de células germinales; tumor extragonadal de células germinales; cáncer de vías biliares extrahepáticas; cáncer de vesícula biliar; cáncer gástrico (de estómago); carcinoide gástrico; tumor carcinoide gastrointestinal; tumor del estroma gastrointestinal; tumor de células germinales: tumor trofoblástico gestacional extracraneal, extragonadal u ovárico; tumor trofoblástico gestacional, sitio primario desconocido; glioma; glioma del tronco encefálico; glioma, vía óptica infantil e hipotalámico; leucemia de células pilosas; cáncer de cabeza y cuello; cáncer de corazón; cáncer hepatocelular (hígado); linfoma de Hodgkin; cáncer de hipofaringe; glioma hipotalámico y de la vía óptica; melanoma intraocular; carcinoma de células de los islotes (páncreas endocrino); sarcoma de Kaposi; cáncer de riñón (cáncer de células renales); histiocitosis de células de Langerhans; cáncer de laringe; cáncer de labio y cavidad oral; liposarcoma; cáncer de hígado (primario); cáncer de pulmón no microcítico; cáncer de pulmón microcítico; linfoma primario del sistema nervioso central; macroglobulinemia, Waldenström; cáncer de mama masculino; histiocitoma fibroso maligno de hueso/osteosarcoma; meduloblastoma; meduloepitelioma; melanoma; melanoma, intraocular (ojo); cáncer de células de Merkel; carcinoma de piel de células de Merkel; mesotelioma; mesotelioma, adulto maligno; cáncer de cuello escamoso metastásico con tumor primario oculto; cáncer de boca; síndrome de neoplasia endocrina múltiple; mieloma múltiple/neoplasia de células plasmáticas; micosis fungoide, síndromes mielodisplásicos; enfermedades mielodisplásicas/mieloproliferativas; leucemia mielógena, crónica; leucemia mielóide, aguda del adulto; leucemia mielóide, aguda infantil; mieloma, múltiple (cáncer de la médula ósea); trastornos mieloproliferativos crónicos; cáncer de cavidad nasal y senos paranasales; carcinoma nasofaríngeo de Hodgkin; neuroblastoma, cáncer de pulmón no microcítico; linfoma no Hodgkin; oligodendroglioma; cáncer bucal; cáncer de cavidad oral; cáncer orofaríngeo; osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno de hueso; cáncer de ovario; cáncer epitelial de ovario (tumor del estroma epitelial superficial); tumor de células germinales de ovario; tumor de ovario de bajo potencial maligno; cáncer de páncreas; cáncer de páncreas, células de los islotes; papilomatosis; cáncer de seno paranasal y cavidad nasal; cáncer de paratiroides; cáncer de pene; cáncer de faringe; feocromocitoma; astrocitoma pineal; germinoma pineal; tumores del parénquima pineal de diferenciación intermedia; pineoblastoma y tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales; tumor hipofisario; adenoma hipofisario; 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; carcinoma del tracto respiratorio que implica el gen NUT en el cromosoma 15; retinoblastoma; rhabdomioma, infancia; cáncer de glándulas salivales; sarcoma, familia de tumores de Ewing; síndrome de Sézary; cáncer de piel (melanoma); cáncer de piel (no melanoma); cáncer de pulmón microcítico; cáncer de intestino delgado sarcoma de tejidos blandos; sarcoma de tejidos blandos; tumor de la médula espinal; carcinoma de células escamosas; cáncer de cuello escamoso con primario oculto, metastásico; cáncer de estómago (gástrico); tumor neuroectodérmico primitivo supratentorial; linfoma de células T, cutáneo (micosis fungoide y síndrome de Sézary); cáncer testicular; cáncer de garganta; timoma; timoma y carcinoma tímico; cáncer de tiroides; cáncer de tiroides infantil; cáncer de células de transición de la pelvis renal y el uréter; cáncer de uretra; cáncer de útero, endometrio; sarcoma uterino; cáncer de vagina; cáncer de vulva; y tumor de Wilms.

En otra realización, se administra una partícula de arenavirus que expresa un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo, o una composición del mismo, y un inhibidor del punto de control inmunitario a un sujeto de cualquier grupo de edad que padece, es susceptible o está en riesgo de padecer una enfermedad neoplásica. En una realización específica, se administra una partícula de arenavirus que expresa un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo, o una composición del mismo, y un inhibidor de punto de control inmunitario a un sujeto con un sistema inmunitario comprometido, a una persona embarazada, a un sujeto que se somete a un trasplante de órgano o médula ósea, un sujeto que toma fármacos inmunosupresores, un sujeto que se somete a hemodiálisis, un sujeto que tiene cáncer, o un sujeto que padece, es susceptible, o está en riesgo de padecer una enfermedad neoplásica. En una realización más específica, se administra una partícula de arenavirus que expresa un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo, o una composición del mismo, y un inhibidor de punto de control inmunitario a un sujeto que es un niño que tiene 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 años que padece, es susceptible o está en riesgo de padecer una enfermedad neoplásica. En otra realización específica más, se administra una partícula de arenavirus que expresa un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo, o una composición del mismo, y un inhibidor de punto de control inmunitario a un sujeto que es un bebé que padece, es susceptible o

está en riesgo de padecer una enfermedad neoplásica. En otra realización específica más, se administra una partícula de arenavirus que expresa un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo, o una composición del mismo, y un inhibidor de punto de control inmunitario 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 o está en riesgo de padecer una enfermedad neoplásica. En otra realización específica más, se administra una partícula de arenavirus que expresa un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo, o una composición del mismo, y un inhibidor de punto de control inmunitario a un sujeto de edad avanzada que padece, es susceptible o está en riesgo de padecer una enfermedad neoplásica. En una realización más específica, se administra una partícula de arenavirus que expresa un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo, o una composición del mismo, y un inhibidor de punto de control inmunitario a 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.

En otra realización, se administra una partícula de arenavirus que expresa un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo, o una composición del mismo, y un inhibidor de punto de control inmunitario a sujetos con un mayor riesgo de metástasis del cáncer. En una realización específica, se administra una partícula de arenavirus que expresa un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo, o una composición del mismo, y un inhibidor de punto de control inmunitario a sujetos en el período neonatal con un sistema inmunitario neonatal y, por lo tanto, inmaduro.

En otra realización, se administra una partícula de arenavirus que expresa un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo, o una composición del mismo, y un inhibidor de punto de control inmunitario a un sujeto que tiene un cáncer de grado 0 (es decir, neoplasia in situ), grado 1, grado 2, grado 3 o grado 4 o una subcategoría del mismo, tal como grado 3A, 3B o 3C, o un equivalente del mismo.

En otra realización, se administra una partícula de arenavirus que expresa un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo, o una composición del mismo, y un inhibidor de punto de control inmunitario a un sujeto que tiene cáncer en una etapa de tumor, ganglio, metástasis (TNM) de cualquier combinación seleccionada de tumor T1, T2, T3 y T4, y ganglio N0, N1, N2 o N3, y metástasis M0 y M1.

El tratamiento con éxito de un paciente con cáncer puede evaluarse como la prolongación de la supervivencia esperada, la inducción de una respuesta inmunitaria antitumoral o la mejora de una característica particular de un cáncer. 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 de ganglios (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, crograinina 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 en porcentaje, puede ser de al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90% (p. ej., supervivencia, o volumen o dimensiones lineales de un tumor).

En otra realización, se administra una partícula de arenavirus que expresa un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo, o una composición del mismo, y un inhibidor de punto de control inmunitario a un sujeto que tiene un cáncer latente (p. ej., el sujeto está en remisión). Por tanto, en una realización, un método es para prevenir la reactivación de un cáncer.

En otra realización, se administra una partícula de arenavirus que expresa un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo, o una composición del mismo, y un inhibidor de punto de control inmunitario a un sujeto que tiene un cáncer recurrente.

En otra realización, se administra una partícula de arenavirus que expresa un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo, o una composición del mismo, y un inhibidor de punto de control inmunitario a un sujeto con una predisposición genética a un cáncer. En otra realización, se administra a un sujeto con factores de riesgo una partícula de arenavirus que expresa un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo, o una composición del mismo, y un inhibidor de punto de control inmunitario. Los factores de riesgo de ejemplo incluyen el envejecimiento, tabaco, exposición al sol, exposición a la radiación, exposición a sustancias químicas, antecedentes familiares, alcohol, mala alimentación, falta de actividad física o sobrepeso.

En otra realización, se administra una partícula de arenavirus que expresa un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo, o una composición del mismo, y un inhibidor de punto de control inmunitario a sujetos que padecen uno o más tipos de cáncer. En otras realizaciones, cualquier tipo de enfermedad neoplásica, tal como el cáncer, que sea susceptible de tratamiento con las composiciones en el contexto de la invención podría ser el objetivo.

En otra realización, la administración de una partícula de arenavirus que expresa un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo, o una composición del mismo a sujetos confiere inmunidad mediada por células (CMI) contra una célula neoplásica o tumor, tal como una célula cancerosa o tumor. Sin estar ligados a ninguna teoría, en otra realización, una partícula de arenavirus que expresa un antígeno tumoral, antígeno

asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo, o una composición del mismo infecta y expresa antígenos de interés en células presentadoras de antígenos (APC) del hospedante (p. ej., macrófagos) 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 que expresa un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo, o una composición del mismo a sujetos induce respuestas de células T CD4+ y CD8+ plurifuncionales coproductoras de IFN-γ y TNF-α específicas del cáncer (IFN-γ es producido por células T CD4+ y CD8+ y TNF-α es producido por células T CD4+) de gran magnitud para tratar una enfermedad neoplásica.

En otra realización, la administración de una partícula de arnavirus que expresa un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo, o una composición del mismo y un inhibidor de punto de control inmunitario aumenta o mejora uno o más resultados clínicos para el tratamiento del cáncer. Ejemplos no limitantes de dichos resultados son la supervivencia global, supervivencia sin progresión, tiempo hasta la progresión, tiempo hasta el fracaso del tratamiento, supervivencia sin acontecimientos, tiempo hasta el siguiente tratamiento, tasa de respuesta global y duración de la respuesta. El aumento o mejora en uno o más de los resultados clínicos puede ser de al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, o más, en comparación con un paciente o grupo de pacientes que tienen la misma enfermedad neoplásica en ausencia de tal tratamiento.

Los cambios en la función de respuesta de inmunidad mediada por células (CMI) contra una célula neoplásica o tumor, incluyendo una célula cancerosa o tumor, inducidos mediante la administración de una partícula de arnavirus que expresa un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo, o una composición del mismo, en los sujetos se pueden medir por 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., *Nat Rev Immunol.* 2004; 4(8):648-55), ensayos de proliferación de linfocitos (véase, p. ej., Bonilla F.A. et al., *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2008; 101:101-4; y Hicks M.J. et al., *Am J Clin Pathol.* 1983; 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., *J Immunol Methods.* 1983; 65:109-121; y Hutchings P.R. et al., *J Immunol Methods.* 1989; 120:1-8), o ensayos de citotoxicidad de células citolíticas naturales (véase, p. ej., Bonilla F.A. et al., *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2005 mayo; 94(5 Suplemento 1):S1-63).

Los inhibidores de puntos de control inmunitarios que se pueden usar de acuerdo con la invención y con las composiciones proporcionadas en el presente documento pueden dirigirse a cualquier regulador negativo de puntos de control. En determinadas realizaciones, dicho regulador negativo de puntos de control es una proteína implicada en la activación de células T. En ciertas realizaciones más específicas, tal regulador negativo de puntos de control es el antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), CD80, CD86, muerte celular programada 1 (PD-1), ligando de muerte celular programada 1 (PD-L1), ligando de muerte celular programada 2 (PD-L2), gen de activación de linfocitos 3 (LAG-3; también conocido como CD223), galectina-3, atenuador de linfocitos B y T (BTLA), proteína de membrana 3 de células T (TIM3), galectina-9 (GAL9), B7-H1, B7-H3, B7-H4, inmunorreceptor de células T con dominios Ig e ITIM (TIGIT/Vstm3/WUCAM/VSIG9), supresor de Ig de dominio V de la activación de células T (VISTA), proteína relacionada con el receptor del factor de necrosis tumoral inducida por glucocorticoides (GITR), mediador de entrada del virus del herpes (HVEM), OX40, CD27, CD28, CD137. CGEN-15001T, CGEN-15022, CGEN-15027, CGEN-15049, CGEN-15052 o CGEN-15092. En la Tabla 4 se presenta una descripción general de tales reguladores de puntos de control y medicamentos que se dirigen a ellos.

Tabla 4

Objetivo para inmunoterapia	Modo de acción	Nombre comercial	Aprobación FDA	Indicación (humano)	Evaluación preclínica
PD1/PD1-L(1,2) (proteína de muerte celular programada 1)	Anticuerpos que se unen a PD1 (Bloqueo de receptor)	Nivolumab (Opdivo-Bristol Myers Squibb)	Sí	Melanoma metastásico, cáncer de pulmón no microcítico	Sí.
		Pembrolizumab (Keytruda, MK-3475 Merck)	Sí	Melanoma metastásico (ensayos clínicos para cáncer de pulmón, linfoma, mesotelioma)	Ab PD1 solo y en combinación con CTLA4 se han evaluado sistemáticamente en 7 modelos de ratón diferentes. (Barnes et al, Póster de la reunión anual de la AACR n.º 3362 (2015))
		Pidilizumab (CT-011, Cure Tech)	No	Ensayos clínicos - cánceres múltiples	
	Los anticuerpos se unen a PD-L1 (inhiben la unión al receptor)	BMS936559 (Bristol Myers-Squibb)	No	Melanoma, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de ovario Fase I: VIH	También se han evaluado P815-B7-H1 modificado (mastocitoma). (Véase Hirano et al., <i>Cancer Res.</i> , 65(3), 1089-96 (2005))
		MPDL3280A (Roche)	No	NSCLC y melanoma (tumor localmente avanzado o metastásico)	

Objetivo para inmunoterapia	Modo de acción	Nombre comercial	Aprobación FDA	Indicación (humano)	Evaluación preclínica
CTLA4 (antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos)	Al unirse a CTLA4, los compuestos mejoran la activación de las células T y bloquean las rutas coestimuladoras de células T de B7-1 y B7-2	Ipilimumab (MDX010, Yervoy; Bristol Myers-Squibb) Tremelimumab (CP-675,206, Pfizer)	Si No	Melanoma Ensayos clínicos - Cánceres Múltiples	Si. Véase Simpson et al. <i>J.Exp.Med.</i> 2013: 210(9):1695-710 Se asignaron habilidades variables a diferentes clones de Ab.
TIM-3 (inmunoglobulina de células T y proteína 3 que contiene mucina)	Las IgG anti-TIM-3 inhiben la unión de TIM-3 a su receptor y/o ligando (quizás galectina-9)	n.a.	No	n.a.	Si. (Véase Sakuishi et al., <i>J Exp. Med.</i> , 207(10), 2187-94 (2010)) CT26, 4T1 y B16 se probaron en sus respectivos contextos.
LAG-3/ Galectina-3 (gen-3 activado por linfocitos)	Anticuerpos anti-LAG-3/agotamiento de galectina-3	n.a.	No	n.a.	Si. NT2.5 (línea de células tumorales que expresan neu) descrito en Kouo et al., <i>Cancer Immunol Res.</i> 3(4):412-23 (2015). B16 y MC38 descritos en Woo et al., <i>Cancer Res</i> 72(4)_917-27 (.2012).
TIGIT (inmunorreceptor de células T con dominios Ig e ITIM)	Los anticuerpos contra TIGIT inhiben la unión al PVR (receptor) alterando la señalización inhibitoria. Además, CD226 puede unirse a PVR en su lugar y desplegar su función de activación de células T/también podría estar implicado en la inhibición de células NK	En desarrollo (Genentech)	No	n.a.	Si. (Véase Johnston et al., <i>Cancer Cell.</i> 26(6):923-37 (2014)).
BTLA (atenuador de linfocitos B y T)					
VISTA (supresor de Ig de dominio V de la activación de células T)					

5 En determinadas realizaciones, una partícula de arenavirus que expresa un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo o una composición del mismo, y un inhibidor de punto de control inmunitario 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 arenavirus que expresa un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo, o una composición del mismo, se administra en dos o más inyecciones separadas a lo largo de un período de 6 meses, un período de 12 meses, un período de 24 meses período, o un período de 48 meses. En determinadas realizaciones, la partícula de arenavirus que expresa un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo, o una composición del mismo, 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 dosis.

15 En un ejemplo, las inyecciones cutáneas se realizan en múltiples sitios del cuerpo para reducir la extensión de las reacciones cutáneas locales. En un día de vacunación dado, el paciente recibe la dosis total asignada administrada de una jeringa en 3 a 5 inyecciones intradérmicas de la dosis separadas (p. ej., al menos 0,4 ml, 0,2 ml o 0,1 ml) cada una en una extremidad separadas 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 subsiguientes, los sitios de inyección se rotan a diferentes extremidades en el sentido de las agujas del reloj o en el sentido contrario a las agujas del reloj.

20 En determinadas realizaciones, los métodos comprenden además la coadministración de la partícula de arenavirus y un inhibidor de punto de control inmunitario. En ciertas realizaciones, la coadministración es simultánea. En otra realización, la partícula de arenavirus se administra antes de la administración del inhibidor de punto de control inmunitario. En otras realizaciones, la partícula de arenavirus se administra después de la administración del inhibidor de punto de control inmunitario. En determinadas realizaciones, el intervalo entre la administración de la partícula de arenavirus y el inhibidor de punto de control inmunitario es de 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 determinadas realizaciones, el intervalo entre la administración de la partícula de arenavirus y el inhibidor de punto de control inmunitario es de aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días,

- aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 1 semana, aproximadamente 8 días, aproximadamente 9 días, aproximadamente 10 días, aproximadamente 11 días, aproximadamente 12 días, aproximadamente 13 días, 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 determinadas realizaciones, el intervalo entre la administración de la partícula de arnavirus y el inhibidor de punto de control inmunitario es de aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses o aproximadamente 6 meses. En algunas realizaciones, el método incluye además la administración de al menos una terapia adicional.
- 5
- 10 En ciertas realizaciones, los métodos para tratar una enfermedad neoplásica en un sujeto comprenden administrar al sujeto una o más partículas de arnavirus y un inhibidor de indolamina-2,3-dioxigenasa ("IDO"). El método para tratar una enfermedad neoplásica en un sujeto puede incluir administrar al sujeto una o más partículas de arnavirus que expresan un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo, o una composición del mismo, y un inhibidor de IDO. En determinadas realizaciones, los métodos para inducir una respuesta inmunitaria
- 15
- 20 contra una célula o tejido neoplásico, tal como una célula cancerosa o tumor, en un sujeto comprenden la administración al sujeto de una partícula de arnavirus que expresa un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo, o una composición del mismo, y un inhibidor de IDO. En ciertas realizaciones, los métodos comprenden la coadministración de una partícula de arnavirus y un inhibidor de IDO. En ciertas realizaciones, los métodos comprenden la coadministración de la partícula de arnavirus, un inhibidor de punto de control inmunitario y un inhibidor de IDO.
- En otra realización, se administran dos partículas de arnavirus en un régimen de tratamiento en relaciones molares que están en el intervalo de aproximadamente 1:1 y 1:1000, que incluyen en particular: relación 1:1, relación 1:2, relación 1:5, relación 1:10, relación 1:20, relación 1:50, relación 1:100, relación 1:200, relación 1:300, relación 1:400, relación 1:500, relación 1:600, relación 1:700, relación 1:800, relación 1:900, relación 1:1000.
- 25
- 30 En ciertas realizaciones, un método para tratar la enfermedad neoplásica es el método en donde se administra primero una primera partícula de arnavirus como "sensibilización" y se administra una segunda partícula de arnavirus como "refuerzo". La primera y la segunda partículas de arnavirus pueden expresar los mismos o diferentes antígenos tumorales, antígenos asociados a tumores o fragmentos antigénicos de los mismos. Alternativamente, o adicionalmente, en algunas realizaciones determinadas, la administración de "sensibilización" y de "refuerzo" se realizan con una partícula de arnavirus derivada de diferentes especies. En ciertas realizaciones específicas, la administración de "sensibilización" se realiza con una partícula de arnavirus derivada del LCMV, y el "refuerzo" se realiza con una partícula de arnavirus derivada del virus Junín. En ciertas realizaciones específicas, la administración de "sensibilización" se realiza con una partícula de arnavirus derivada del virus Junín, y el "refuerzo" se realiza con una partícula de arnavirus derivada del LCMV.
- 35
- 40 En ciertas realizaciones, la administración de una primera partícula de arnavirus que expresa un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo, seguida de la administración de una segunda partícula de arnavirus que expresa un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo da como resultado una mayor respuesta de células T CD8+ específicas de antígeno que la administración de una única partícula de arnavirus que expresa un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo. En ciertas realizaciones, el recuento de células T CD8+ específicas de antígeno aumenta en 50%, 100%, 150% o 200% después de la segunda administración en comparación con la primera administración. En determinadas realizaciones, la administración de una tercera partícula de arnavirus que expresa un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo da como resultado una mayor respuesta de células T CD8+ específicas de antígeno que la administración de dos partículas de arnavirus consecutivas que expresan un
- 45
- 50 antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo. En determinadas realizaciones, el recuento de células T CD8+ específicas de antígeno aumenta en aproximadamente 50%, aproximadamente 100%, aproximadamente 150%, aproximadamente 200% o aproximadamente 250% después de la tercera administración en comparación con la primera administración.
- 55
- En ciertas realizaciones, los métodos para tratar una enfermedad neoplásica comprenden administrar dos o más partículas de arnavirus, en donde las dos o más partículas de arnavirus son homólogas, y en donde el intervalo de tiempo entre cada administración es de aproximadamente 1 semana, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 5 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 7 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses, aproximadamente 6 meses, aproximadamente 7 meses, aproximadamente 8 meses, aproximadamente 9 meses, aproximadamente 10 meses, aproximadamente 11 meses, aproximadamente 12 meses, aproximadamente 18 meses o aproximadamente 24 meses.
- 60
- En determinadas realizaciones, la administración de una primera partícula de arnavirus que expresa un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo y una segunda partícula de arnavirus heteróloga que expresa un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo produce una mayor respuesta de células T CD8+ que la administración de una primera partícula de arnavirus que expresa un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo y una segunda partícula de arnavirus

homóloga que expresa un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo.

5.9 Composiciones, administración y dosis

Las vacunas, composiciones inmunogénicas (p. ej., formulaciones de vacunas) y las composiciones farmacéuticas comprenden una partícula de arnavirus para usar según la invención y un inhibidor de punto de control inmunitario.

5 Tales vacunas, composiciones inmunógenas y composiciones farmacéuticas pueden formularse según procedimientos estándar en la técnica.

10 En una realización, las composiciones proporcionadas en el presente documento comprenden una partícula de arnavirus infecciosa, competente para la replicación y un inhibidor de punto de control inmunitario. En otra realización, las composiciones proporcionadas en el presente documento comprenden una partícula de arnavirus infecciosa, de replicación deficiente y un inhibidor de punto de control inmunitario. Dichas composiciones pueden usarse en métodos para tratar una enfermedad neoplásica. En otra realización específica, las composiciones inmunogénicas proporcionadas en el presente documento pueden usarse para inducir una respuesta inmunitaria en un hospedante al que se administra la composición. Las composiciones inmunogénicas proporcionadas en el presente documento se pueden usar como vacunas y, en consecuencia, se pueden formular como composiciones farmacéuticas. En una realización específica, las composiciones inmunogénicas se usan en el tratamiento de una enfermedad neoplásica en un sujeto (p. ej., sujeto humano). En otras realizaciones, la vacuna, composición inmunogénica o composición farmacéutica son adecuadas para administración veterinaria y/o humana.

20 En ciertas realizaciones, en el presente documento se proporcionan composiciones inmunogénicas que comprenden una partícula de arnavirus (o una combinación de diferentes partículas de arnavirus). 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 la administración en combinación con una composición descrita en el presente documento puede administrarse antes, simultáneamente 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 el presente documento, aumenta, mejora y/o potencia la respuesta inmunitaria a una partícula de arnavirus infecciosa de replicación deficiente, pero cuando el compuesto se administra solo no genera una respuesta inmunitaria a la partícula de arnavirus infecciosa, de replicación deficiente. En algunas realizaciones, el adyuvante genera una respuesta inmunitaria a la partícula de arnavirus infecciosa, de replicación deficiente y no produce alergia u otra reacción adversa. Los adyuvantes pueden potenciar una respuesta inmunitaria por varios mecanismos que incluyen, p. ej., el reclutamiento de linfocitos, estimulación de células B y/o T y estimulación de macrófagos. 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 sales minerales o adyuvantes de gel de sales minerales, adyuvantes en partículas, adyuvantes en micropartículas, 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 3 Des-O-acilado (MPL) (véase el documento GB 2220211), MF59 (Novartis), AS03 (GlaxoSmithKline), AS04 (GlaxoSmithKline), polisorbato 80 (Tween 80; ICL Americas, Inc.), compuestos de imidazopiridina (véase la solicitud internacional N.º PCT/US2007/064857, publicado como publicación internacional N.º WO2007/109812), compuestos de imidazoquinoxalina (véase la solicitud internacional N.º PCT/US2007/064858, publicado como publicación internacional N.º WO2007/109813) y saponinas, tales como QS21 (véase Kensil et al., en *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman, Plenum Press, NY, 1995); patente de EE. UU. N.º 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 inmunoestimulantes, tales como el monofosforil lípido A (véase Stoute et al., *N. Engl. J. Med.* 336, 86-91 (1997)).

45 Las composiciones de la invención comprenden las partículas de arnavirus trisegmentadas, infecciosas, de replicación deficiente, solas o junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable y un inhibidor de punto de control inmunitario. Pueden usarse suspensiones o dispersiones de partículas de arnavirus genéticamente modificadas, especialmente suspensiones o dispersiones acuosas isotónicas. Las composiciones farmacéuticas se pueden esterilizar 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 manera conocida, por ejemplo mediante medios de procedimientos convencionales de dispersión y suspensión. En ciertas realizaciones, dichas dispersiones o suspensiones pueden comprender agentes reguladores de la viscosidad. Las suspensiones o dispersiones se mantienen a temperaturas de aproximadamente 2-8°C, o preferiblemente para un almacenamiento más prolongado, se pueden congelar y luego descongelar poco antes de su uso. Para inyección, la vacuna o las preparaciones inmunogénicas pueden formularse en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hanks, solución de Ringer o tampón salino fisiológico. La solución puede contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión.

60 En ciertas realizaciones, las composiciones comprenden adicionalmente un conservante, p. ej., el derivado de mercurio timerosal. En una realización específica, las composiciones farmacéuticas comprenden de 0,001% a 0,01% de timerosal. En otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas no comprenden un conservante.

Las composiciones farmacéuticas comprenden de aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^{11} unidades formadoras de focos de partículas de arnavirus modificadas genéticamente. Las formas de dosis unitarias para administración parenteral son, por ejemplo, ampollas o viales, p. ej., viales que contienen aproximadamente de 10^3 a 10^{10} unidades formadoras de focos o de 10^5 a 10^{15} partículas físicas de partículas de arnavirus modificadas genéticamente.

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

Para la administración por vía intranasal o por inhalación, la preparación para usar según la presente invención puede administrarse convenientemente en forma de una presentación de pulverizador 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 puede determinarse proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. Se pueden formular cápsulas y cartuchos de, p. ej., gelatina para usar en un inhalador o insufladores que contienen una mezcla de polvo del compuesto y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

La dosis del principio 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, las composiciones se pueden administrar al paciente en una dosis única que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la partícula de arnavirus y una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de punto de control inmunitario. En algunas realizaciones, la partícula de arnavirus se puede administrar al paciente en una dosis única que comprende una partícula de arnavirus y un inhibidor de punto de control inmunitario, cada uno en una cantidad terapéuticamente eficaz.

En ciertas realizaciones, la composición se administra al paciente como una dosis única seguida de una segunda dosis de tres a seis semanas más tarde. De acuerdo con estas realizaciones, las inoculaciones de refuerzo pueden administrarse a los sujetos en intervalos de seis a doce meses después de la segunda inoculación. En determinadas realizaciones, las inoculaciones de refuerzo pueden utilizar una partícula de arnavirus diferente o composición de la misma. En algunas realizaciones, la administración de la misma composición que se describe en el presente documento puede repetirse y estar separada por 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.

En determinadas realizaciones, la vacuna, composición inmunogénica o composición farmacéutica que comprende una partícula de arnavirus se puede utilizar como vacunación viva. Las dosis de ejemplo para una partícula de arnavirus vivo pueden variar de 10-100, 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 se puede administrar a un sujeto una, dos, tres o más veces con intervalos tan a menudo como sea necesario. En otra realización, se formula un arnavirus vivo de manera que una dosis de 0,2 ml contiene $10^{6.5}$ - $10^{7.5}$ unidades de foco fluorescentes de partículas vivas de arnavirus. En otra realización, se formula una vacuna inactivada de manera que contenga de aproximadamente 15 μ g a aproximadamente 100 μ g, de aproximadamente 15 μ g a aproximadamente 75 μ g, de aproximadamente 15 μ g a aproximadamente 50 μ g, o de aproximadamente 15 μ g a aproximadamente 30 μ g de un arnavirus.

También se describen procedimientos y usos de una partícula de arnavirus y un inhibidor de punto de control inmunitario para la fabricación de vacunas en forma de preparados farmacéuticos, que comprenden la partícula de arnavirus y el inhibidor de punto de control inmunitario como principio activo. Además, también se proporciona una combinación de una partícula de arnavirus y un inhibidor de punto de control inmunitario para usar en el tratamiento de una enfermedad neoplásica según la invención. En ciertas realizaciones, la combinación está en la misma composición farmacéutica. En ciertas realizaciones, la combinación no está en la misma composición farmacéutica, tal como cuando la partícula de arnavirus y el inhibidor de punto de control inmunitario deben administrarse por separado. Las composiciones farmacéuticas de la presente solicitud se preparan de manera en sí conocida, por ejemplo mediante procedimientos convencionales de mezcla y/o dispersión.

En ciertas realizaciones, los métodos y composiciones se usan en combinación con medicina personalizada. La medicina personalizada busca beneficiar a los pacientes mediante el uso de información del perfil genético y/o epigenético único de un paciente para predecir la respuesta de un paciente a diferentes terapias e identificar qué terapias tienen más probabilidades de ser efectivas. Las técnicas que se pueden usar en combinación con los métodos y composiciones proporcionados en el presente documento para obtener el perfil genético y/o epigenético único de un paciente incluyen, pero no se limitan a secuenciación del genoma, secuenciación del ARN, análisis de la expresión génica e identificación de un antígeno tumoral (p. ej., neoantígeno), antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo. En determinadas realizaciones, la selección de un antígeno tumoral de arnavirus o antígeno

asociado a tumor para usar según la invención y las composiciones proporcionadas en el presente documento se realiza basándose en el perfil genético del paciente. En ciertas realizaciones, la selección de un antígeno tumoral de arenavirus o antígeno asociado a tumor para usar según la invención y las composiciones proporcionadas en el presente documento se realiza basándose en el perfil genético de un tumor o célula tumoral.

5 También se proporcionan en el presente documento kits que se pueden usar de acuerdo con la invención. En determinadas realizaciones, el kit proporcionado en el presente documento puede incluir uno o más envases. Estos envases pueden contener para el almacenamiento las composiciones (p. ej., composición farmacéutica, inmunogénica o de vacuna) proporcionadas en el presente documento. También se incluyen en el kit las instrucciones de uso. Estas instrucciones describen, con suficiente detalle, un protocolo de tratamiento para usar las composiciones contenidas en ellos. Por ejemplo, las instrucciones pueden incluir instrucciones de dosis y administración o los métodos para tratar una enfermedad neoplásica.

15 En ciertas realizaciones, un kit proporcionado en el presente documento incluye envases que contiene cada uno los principios activos para llevar a cabo los métodos descritos en el presente documento. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, el kit proporcionado en el presente documento incluye dos o más envases e instrucciones de uso, en donde uno de los envases comprende una partícula de arenavirus infecciosa, de replicación deficiente y otro envase que comprende un inhibidor de punto de control inmunitario.

5.10 Ensayos

5.10.1 Ensayos de detección de arenavirus

20 El experto en la técnica podría detectar un segmento genómico de arenavirus o partícula de arenavirus trisegmentada, utilizando técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, se puede usar la RT-PCR con cebadores que son específicos para un arenavirus para detectar y cuantificar un segmento genómico de arenavirus que se ha genomanipulado para llevar un ORF en una posición diferente de la posición natural del ORF o un partícula de arenavirus trisegmentada. Se pueden usar transferencia Western, ELISA, radioinmunoensayo, inmunoprecipitación, inmunocitoquímica o inmunocitoquímica junto con FACS para cuantificar los productos génicos del segmento genómico de arenavirus o la partícula de arenavirus trisegmentada.

5.10.2 Ensayo para medir la infectividad

30 Puede usarse cualquier ensayo conocido por el experto en la técnica para medir la infectividad de una preparación de vectores de arenavirus. Por ejemplo, la determinación del título de virus/vector se puede realizar mediante un "ensayo de unidades formadoras de focos" (ensayo FFU). En resumen, células de complementación, p. ej., células MC57 o HEK293 que expresan opcionalmente la proteína GP del LCMV se sembraron en placa y se inocularon 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 adhiera a las células, la monocapa se cubre con metilcelulosa. Cuando las placas se incuban más, las células infectadas originales liberan progenie viral. Debido a la superposición de metilcelulosa, la propagación de los nuevos virus se restringe 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 tanto, contables utilizando anticuerpos contra LCMV-NP u otra proteína expresada por la partícula de arenavirus o la partícula de arenavirus trisegmentada y una reacción de color basada en HRP. El título de un virus/vector se puede calcular en unidades formadoras de focos por mililitro (FFU/ml).

5.10.3 Crecimiento de una partícula de Arenavirus

40 El crecimiento de una partícula de arenavirus se puede evaluar mediante cualquier método conocido en la técnica o descrito en el presente documento (p. ej., cultivo de células). El crecimiento viral se puede determinar mediante inoculación de diluciones en serie de una partícula de arenavirus 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 usando métodos estándar.

5.10.4 ELISA del suero

45 La determinación de la respuesta inmunitaria humoral tras la vacunación de animales (p. ej., ratones, cobayos) se puede hacer mediante ELISA del suero específico de antígeno (ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas). En resumen, las placas se recubren con antígeno (p. ej., proteína recombinante), se bloquean para evitar la unión inespecífica de anticuerpos y se incuban con diluciones seriadas de sueros. Después de la incubación, los anticuerpos séricos unidos se pueden detectar, p. ej., utilizando un anticuerpo específico anti-especie (p. ej., ratón, cobayo) acoplado a enzima (detectando la IgG total o subclases de IgG) y la subsiguiente reacción de color. Los títulos de anticuerpos se pueden determinar como, p. ej., título medio geométrico de punto final.

También se puede realizar ELISA de inmunocaptura (IC-ELISA) (véase Shanmugham et al., 2010, *Clin. Vaccine Immunol.* 17(8):1252-1260), en donde los agentes de captura se entrecruzan en perlas.

5.10.5 Ensayo para medir la actividad neutralizante de anticuerpos inducidos

La determinación de los anticuerpos neutralizantes en los sueros se realiza con el siguiente ensayo celular utilizando células ARPE-19 de la ATCC y un virus marcado con GFP. Además, se usa suero complementario (p. ej., suero de cobayo) como fuente de complemento exógeno. El ensayo se inicia con la siembra de $6,5 \times 10^3$ células/pocillo (50 μ l/pocillo) en una placa de 384 pocillos uno o dos días antes del uso para la neutralización. La neutralización se hace en placas de cultivo de tejidos estériles de 96 pocillos sin células durante 1 hora 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 comprobar la fiabilidad de todos los resultados. Los títulos (EC50) se determinan utilizando un ajuste de curva logística de 4 parámetros. Como ensayo adicional, los pocillos se comprueban con un microscopio de fluorescencia.

5.10.6 Ensayo de reducción en placa

En resumen, los ensayos de reducción (neutralización) en placa para el LCMV se pueden realizar usando un LCMV competente o deficiente en replicación que se marca con proteína verde fluorescente, se puede usar suero de conejo al 5% como fuente de complemento exógeno y las placas se pueden contar por microscopía de fluorescencia. Los títulos de neutralización se pueden definir como la dilución más alta de suero que da como resultado una reducción de 50%, 75%, 90% o 95% en las placas, en comparación con las muestras de suero de control (preinmunes).

Los genomas de ARN de LCMV de la qPCR se aíslan utilizando el kit QIAamp Viral RNA mini (QIAGEN), de acuerdo con el protocolo proporcionado por el fabricante. Los equivalentes de genoma de ARN del LCMV se detectan por PCR cuantitativa llevada a cabo en un sistema de PCR en tiempo real StepOnePlus (Applied Biosystems) con el Kit de qRT-PCR de un solo paso SuperScript® III Platino® (Invitrogen) y cebadores y sondas (indicador FAM y atenuador NFQ-MGB) específicos para parte de la región codificante de la NP del LCMV u otro tramo genómico de la partícula de arnavirus o la partícula de arnavirus trisegmentada. El perfil de temperatura de la reacción puede ser: 30 min a 60°C, 2 min a 95°C, seguido de 45 ciclos de 15 s a 95°C, 30 s a 56°C. El ARN se puede cuantificar mediante comparación de los resultados de la muestra con una curva patrón preparada a partir de una serie de diluciones log10 de un fragmento de ARN transcrito in vitro cuantificado por espectrofotometría, correspondiente a un fragmento de la secuencia codificante de la NP del LCMV u otro tramo genómico de la partícula de arnavirus o la partícula de arnavirus trisegmentada que contiene los sitios de unión del cebador y la sonda.

5.10.7 Ensayo de neutralización en células de fibroblastos de pulmón de cobayo (GPL)

En resumen, se prepararon diluciones seriadas de sueros de ensayo y de control (antes de la vacunación) en medio completo GPL con suero de conejo complementario (1%) como fuente de complemento exógeno. La serie de dilución abarcó desde 1:40 hasta 1:5120. Las diluciones de suero se incubaron con virus marcado con eGFP (100-200 pfu por pocillo) durante 30 min a 37°C y luego se transfirieron a placas de 12 pocillos que contenían células GPL confluentes. Las muestras se procesaron por triplicado. Después de 2 horas de incubación a 37°C, las células se lavaron con PBS, se volvieron a alimentar con medio completo GPL y se incubaron a 37°C/5% de CO₂ durante 5 días. Las placas se visualizaron por microscopía de fluorescencia, se contaron y compararon con pocillos de control. Aquella dilución de suero que daba como resultado una reducción de 50% en el número de placas en comparación con los controles se denominó el título neutralizante.

5.10.8 Transferencia Western

Las células infectadas cultivadas 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 a temperatura ambiente antes de cargarlas en geles con SDS al 4-12% para electroforesis. Las proteínas se transfieren a las membranas utilizando el dispositivo de transferencia de gel iBlot de Invitrogens y se visualizan mediante tinción de Ponceau. Finalmente, las preparaciones se analizan con anticuerpos primarios dirigidos contra proteínas de interés y anticuerpos secundarios conjugados con fosfatasa alcalina, seguido de tinción con solución de NBT/BCIP de 1 paso (INVITROGEN).

5.10.9 Ensayo de tinción de multímeros de péptido-MHC para la detección de la proliferación de células T CD8+ específicas de antígeno

Puede usarse cualquier ensayo conocido por el experto en la técnica 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 las siguientes etapas, se usa un ensayo de tetrámero para detectar la presencia de células T específicas de antígeno. Con el fin de que una célula T detecte el péptido para el que es específica, debe reconocer tanto el péptido como el tetrámero de las moléculas MHC hechas a la medida para una especificidad de antígeno definida y un haplotipo de MHC de células T (típicamente marcado con fluorescencia). A continuación, el tetrámero se detecta por citometría de flujo a través del marcador fluorescente.

5.10.10 Ensayo ELISPOT para detectar la proliferación de células T CD4+ específicas de antígeno.

Puede usarse cualquier ensayo conocido por el experto en la técnica para ensayar las respuestas de células T CD4+ específicas de antígeno. Por ejemplo, se puede utilizar 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 las siguientes etapas: una placa de Immunospot se recubre con un anticuerpo anti-citoquina. Las células se incuban en la placa de Immunospot. Las células secretan citoquinas y luego se lavan. A continuación, las placas se recubren con un segundo anticuerpo anti-citoquina biotinilado y se visualizan con un sistema de avidina-HRP.

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

Cualquier ensayo conocido por el experto en la técnica se puede utilizar para ensayar la funcionalidad de respuestas de 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 LE 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 las siguientes etapas: 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, le sigue una etapa de lavado y se pueden añadir a las células anticuerpos contra otros marcadores celulares. A continuación, las células se fijan y permeabilizan. Se añaden los anticuerpos anti-citoquina conjugados con fluorocromo y las células pueden analizarse por citometría de flujo.

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

Cualquier ensayo conocido por el experto en la técnica que determine la concentración de partículas virales infecciosas y competentes para la replicación también se puede usar para medir partículas virales de replicación deficiente en una muestra. Por ejemplo, se pueden utilizar para este fin ensayos de FFU con células no de complementación.

Además, los ensayos basados en placa son el método estándar utilizado para determinar la concentración de virus en términos de unidades formadoras de placas (PFU) en una muestra de virus. Específicamente, una monocapa confluyente de células hospedantes no de complementación se infecta con el virus en diluciones variables y se cubre con un medio semisólido, tal como agar, para evitar que la infección por el virus se propague indiscriminadamente. Una placa viral se forma cuando un virus infecta y se replica con éxito en una célula dentro de la monocapa de células fijas y se propaga a 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 placa puede tardar de 2 a 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 unidad de volumen 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 valorar partículas de arnavirus de replicación deficiente o partículas de arnavirus trisegmentadas.

5.10.13 Ensayo para la expresión de antígeno viral

Puede usarse cualquier ensayo conocido por el experto en la técnica para medir la expresión de antígenos virales. Por ejemplo, se pueden realizar ensayos de FFU. Para la detección, se utiliza(n) preparación(es) de anticuerpos monoclonales o policlonales contra los respectivos antígenos virales (FFU específicas de transgén).

5.10.14 Modelos animales

Para investigar la recombinación y la infectividad de una partícula de arnavirus se pueden utilizar modelos animales *in vivo*. En ciertas realizaciones, los modelos animales que pueden usarse para investigar la recombinación y la infectividad de una partícula de arnavirus trisegmentada incluyen ratones, cobayos, conejos y monos. En una realización preferida, los modelos animales que se pueden usar para investigar la recombinación y la infectividad de un arnavirus incluyen ratones. En una realización más específica, los ratones pueden usarse para investigar la recombinación y la infectividad de una partícula de arnavirus que 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 de los arnavirus y la estabilidad del transgén. En algunas realizaciones, el ARN viral se puede aislar del suero del modelo animal. Las técnicas son fácilmente conocidas por los expertos en la técnica. El ARN viral se puede transcribir de forma inversa y el ADNc que lleva los ORF de arnavirus se puede amplificar mediante PCR con cebadores específicos de genes. La citometría de flujo también se puede utilizar para investigar la infectividad de arnavirus y la estabilidad del transgén.

La seguridad, tolerancia y eficacia inmunogénica de las vacunas que comprenden un arnavirus bisegmentado infeccioso de replicación deficiente que expresa un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o fragmento antigénico del mismo descrito en el presente documento o una composición del mismo se pueden ensayar en modelos animales. En ciertas realizaciones, los modelos animales que se pueden usar para ensayar la seguridad, tolerancia y la eficacia inmunogénica de las vacunas y las composiciones de las mismas usadas en el presente documento incluyen

ratones, cobayos, ratas, monos y chimpancés. En una realización preferida, los modelos animales que se pueden usar para ensayar la seguridad, tolerancia y eficacia inmunogénica de las vacunas y las composiciones de las mismas usadas en el presente documento incluyen ratones.

5.10.15 Ensayos de inhibidores de puntos de control inmunitarios

- 5 Se han ideado una serie de ensayos para evaluar las propiedades de los inhibidores de puntos de control propuestos, por ejemplo, como se describe en Lechner et al., *J. Immunother.* 36(9), 477-89 (2013). Los modelos tumorales que se pueden usar para ensayar los métodos y composiciones descritos en el presente documento incluyen Colon26 (CT26), MC38 (adenocarcinoma de colon de ratón), B16F10 (B16), pulmonar de Lewis (LLC), Madison109 (Mad 109), EMT-6 (cáncer de mama murino), 4T1 (4T1) (cáncer de mama murino) y (RENCA) (cáncer renal murino).
- 10 En ciertas realizaciones, en estos sistemas modelo, los "tumores trasplantables" pueden generarse mediante inoculación subcutánea (p. ej., CT26, 4T1, MAD109, RENCA, LLC o B16) o intracerebral (p. ej., GL261, ONC26M4) de líneas de células tumorales en roedores, por ejemplo en ratones hembra adultos. Los tumores pueden desarrollarse en intervalos de tiempo predeterminados, por ejemplo, varios días. Estos tumores crecen en cepas singénicas de roedores inmunocompetentes, por ejemplo, de ratón. Por ejemplo, CT26, 4T1, MAD109 y RENCA se pueden cultivar
- 15 en ratones BALB/c, LLC, B16 y GL261 se pueden cultivar en ratones C57BL/6 y ONC26M4 se puede cultivar en ratones FVBN. Los "tumores espontáneos" pueden generarse por inyección intracerebral de plásmidos de ADN que codifican una serie (p. ej., uno, dos, tres o más) de oncogenes y codifican uno o más indicadores, p. ej., indicador de luciferasa de luciérnaga, en ratones neonatales C57BL/6 o FVBN para transformar las células cerebrales endógenas. El crecimiento de gliomas puede controlarse mediante técnicas conocidas en la técnica, p. ej., formación de imágenes
- 20 por bioluminiscencia. El crecimiento de tumores subcutáneos puede controlarse mediante técnicas conocidas en la técnica, p. ej., mediciones de calibre en tres dimensiones a intervalos de tiempo especificados.

7. Ejemplos

Los ejemplos en esta sección que no se refieren a la invención reivindicada son solo para referencia.

25 7.1 Tratamiento con vector de arnavirus trisegmentado e inhibidor de punto de control inmunitario en un modelo tumoral de adenocarcinoma de colon

Este ejemplo demuestra que el tratamiento con un vector de arnavirus que codifica un antígeno específico de tumor de ejemplo (ovoalbúmina (OVA)) y un inhibidor de punto de control inmunitario (anticuerpo anti-PD1) daba como resultado un efecto sinérgico en el crecimiento tumoral y el porcentaje de supervivencia.

- 30 Para determinar los efectos del tratamiento con un vector de LCMV trisegmentado competente para la replicación que codifica la ovoalbúmina (OVA) (r3LCMV-OVA) y el inhibidor de punto de control anti-PD1 (anticuerpo anti-PD1), se utilizó un modelo de ratón de MC38-OVA subcutáneo. El día 0, se implantaron células tumorales de carcinomas de colon MC38-OVA^{dim} (5×10^5) por vía subcutánea en el flanco de ratones C57BL/6. Cuando los tumores se hicieron palpables (el día 7), los ratones se dejaron sin tratar (grupo 1), se trataron con 12,5 mg/kg de anticuerpo anti-PD1 (clon RMP1-14, BioXCell) (administrado por vía intraperitoneal) los días 13, 17, 20 y 24 (grupo 2), se les inyectó por vía
- 35 intravenosa 10^5 PFU de r3LCMV-OVA el día 7 (grupo 3), o se trataron con una combinación de r3LCMV-OVA y anticuerpo anti-PD1 utilizando el mismo régimen de tratamiento (grupo 4). Cinco ratones se dejaron sin tratar, mientras que todos los demás grupos incluían seis ratones por grupo. Se controló el crecimiento tumoral a lo largo del tiempo así como la supervivencia de los animales.

- 40 El experimento anterior mostró que los tumores establecidos de células de adenocarcinoma de colon MC38 que expresan OVA mostraban una respuesta limitada al tratamiento con anticuerpos anti-PD1 o r3LCMV-OVA solos, mientras que una combinación de inmunoterapia con anticuerpos anti-PD1 y r3LCMV-OVA daba como resultado un efecto de sinergia que conducía a una reducción significativa en el crecimiento del tumor (Fig. 3A) así como un mayor porcentaje de supervivencia (Fig. 3B).

45 7.2. Tratamiento con vectores de arnavirus trisegmentados o bisegmentados que codifican un neoantígeno tumoral e inhibidor de punto de control inmunitario en un modelo tumoral de adenocarcinoma de colon

Este ejemplo demuestra que el tratamiento con un vector de arnavirus que codifica un neoantígeno (MC-38 Adpgk^{mut}) y un inhibidor de punto de control inmunitario (anticuerpo anti-PD1) daban como resultado un efecto sinérgico en la inducción de células T CD8+ específicas de antígeno, crecimiento tumoral y porcentaje de supervivencia.

- 50 Para determinar la inmunogenicidad y los efectos del tratamiento con vectores basados en arnavirus de replicación competente y replicación deficiente que codifican un neoantígeno tumoral (p. ej., MC-38 Adpgk^{mut} (mutación R204M en glucoquinasa dependiente de ADP (Adpgk)); Yadav et al., 2014, *Nature* 515: 572-576), los ratones a los que se implantaron células tumorales MC-38 se evaluaron después del tratamiento con vectores de arnavirus trisegmentados de replicación competente (r3LCMV-Adpgk^{mut}) o bisegmentados de replicación deficiente (r2LCMV-Adpgk^{mut}) que codifican Adpgk^{mut} e inhibición de punto de control de PD1 (anticuerpo anti-PD 1).

- 55 En el día -7 del experimento se implantaron células tumorales MC-38 (1×10^6) por vía subcutánea en el flanco de

ratones C57BL/6. Siete días más tarde, el día 0 del experimento, los ratones se inmunizaron una vez por inyección intravenosa de $5,5 \times 10^5$ PFU de r2LCMV-Adpgk^{mut} (grupos 1 y 2) o $5,5 \times 10^4$ PFU de r3LCMV-Adpgk^{mut} que corresponde a un total de $5,5 \times 10^5$ partículas virales (grupos 3 y 4) o tampón (grupos 5 y 6). Los animales de los grupos 1, 3 y 5 se trataron adicionalmente por inyección intraperitoneal de 6,8 mg/kg de clon RMP1-14 de anticuerpo anti-PD1 los días 0, 3, 6 y 9. La inducción de células T CD8⁺ específicas de Adpgk^{mut} se analizaron posteriormente con pentámeros específicos de MC-38 Adpgk^{mut} (F4B-EH-2Db-ASMTNMELM, ProImmune) en muestras de sangre periférica los días 7 y 14 después de la vacunación.

Los experimentos anteriores mostraron que se indujeron respuestas de células T CD8⁺ específicas de neoantígeno de considerable magnitud en algunos animales tratados con vectores de LCMV que expresan Adpgk^{mut} (grupos 1-4) (Fig. 4A). Sin embargo, se observaron frecuencias de células T CD8⁺ significativamente más altas en animales tratados con el vector de replicación trisegmentado (grupos 3 y 4) en comparación con el vector de replicación deficiente bisegmentado (grupos 1 y 2) (Fig. 4A). Se indujeron respuestas de células T CD8⁺ específicas de neoantígeno más altas en ratones tratados con un vector de LCMV competente para la replicación que expresa Adpgk^{mut} y el anticuerpo anti-PD1 (grupo 3), lo que apunta a un efecto sinérgico del tratamiento combinado sobre la inmunogenicidad de los neoantígenos (Fig. 4A). El nivel más alto de control tumoral y las mejores tasas de supervivencia se observaron en animales tratados con una combinación de r3LCMV-Adpgk^{mut} y anticuerpo anti-PD1 (Fig. 4B y 4C).

7.3. Tratamiento con vectores de arnavirus trisegmentados o bisegmentados e inhibidor de punto de control inmunitario en un modelo de melanoma

Este ejemplo demuestra que el tratamiento con una mezcla de vectores de arnavirus trisegmentados que codifican antígenos de melanoma (glucoproteína 100 ("GP100"), proteína relacionada con tirosinasa 1 ("TRP1") y proteína relacionada con tirosinasa 2 ("TRP2")) con y sin un inhibidor de punto de control inmunitario (anticuerpo anti-PD1) daba como resultado una reducción del tamaño del tumor y una mayor supervivencia de los animales (porcentaje de supervivencia y días totales de supervivencia).

Para determinar los efectos del tratamiento con vectores basados en arnavirus competentes en replicación y de replicación deficiente que codifican antígenos de melanoma e inhibición del punto de control de PD1, se utilizó un modelo de melanoma B16F10 de ratón.

El día 0 del experimento se implantaron células de melanoma B16F10 (1×10^5) por vía subcutánea en el flanco de ratones C57BL/6 (Fig. 5A). El día 7 del experimento, se inyectó a los ratones por vía intravenosa $1,2 \times 10^5$ PFU de RCV (en total) de una mezcla de vectores de arnavirus trisegmentados competentes para la replicación (4×10^4 PFU de cada r3LCMV-GP100, r3LCMV-Trp1 y r3LCMV-Trp2) el día 7 (grupos 1 y 4), $1,2 \times 10^6$ PFU (en total) de una mezcla de vectores de arnavirus bisegmentados de replicación deficiente (4×10^5 PFU de cada rLCMV-GP100, rLCMV-Trp1 y rLCMV-Trp2) el día 7 (grupos 2 y 5), o solo con tampón (grupos 3 y 6). Los días 10, 13, 16, 19 y 22 del experimento, los ratones de los grupos 1, 2 y 3 se trataron adicionalmente con 200 µg de anticuerpo anti-PD1 (clon 29F.1A12, BioXCell), administrados por vía intraperitoneal. Se controló el crecimiento del tumor a lo largo del tiempo, así como el porcentaje de supervivencia de los animales y los días de supervivencia. Había cinco ratones por grupo.

Los experimentos anteriores mostraron que los tumores de melanoma establecidos respondían a un solo tratamiento con una mezcla de vectores de LCMV trisegmentados competentes para replicación que expresaban los antígenos de melanoma GP100, Trp1 y Trp2 (grupo 4), como se muestra por los volúmenes tumorales reducidos (Fig. 5B) y mayores tasas de supervivencia en comparación con los animales de control (grupo 6) (Figs. 5C y 5D). Por el contrario, no hubo respuesta al tratamiento con una mezcla de vectores de LCMV bisegmentados de replicación deficiente que expresaban los mismos antígenos de melanoma, independientemente de la presencia o ausencia de inhibición del punto de control (grupos 2 y 5) (Figs. 5B-5D). El bloqueo de anti-PD1 solo tampoco tuvo efecto sobre el crecimiento tumoral o la supervivencia de los animales (grupo 3) (Figs. 5B-5D). Sin embargo, en ratones tratados con vectores de LCMV trisegmentados que expresan antígenos de melanoma competentes para la replicación en combinación con anticuerpos anti-PD1 (grupo 1), se observó un aumento en las tasas de supervivencia que se correlacionaba con una disminución en los volúmenes tumorales, en comparación con los animales tratados con una mezcla de solo vectores de LCMV trisegmentados competentes para la replicación, lo que apunta a un efecto sinérgico de estas modalidades de tratamiento (Figs. 5B-5D).

8. SECUENCIAS

Las secuencias de la Tabla 5 son secuencias de aminoácidos y secuencias de nucleótidos ilustrativas que se pueden usar con los métodos y composiciones descritos en el presente documento. En algunos casos, se usa una secuencia de ADN para describir la secuencia de ARN de un segmento genómico viral. La secuencia de ARN se puede deducir fácilmente a partir de la secuencia de ADN.

Tabla 5

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
1	<p>Segmento L del clon 13 del virus de la coriomeningitis linfocítica, secuencia completa (GenBank: DQ361066.1) (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 para uridinas ("U") proporciona la secuencia de ARN).</p>	<p>GCGCACCGGGGATCCTAGGCGTTTAGTTGCGCTGTTTGGTTGCACA</p>
		<p>ACFTTCTCGTGAGGCTGTCAGAAGTGGACCTGGCTGATAGCGATG GGTCAAGGCAAGTCCAGAGAGGAGAAAGGCACCAATAGTACAAACA GGGCCGAAATCCTACCAGATACCACCTATCTTGGCCCTTTAAGCTG CAAATCTTGCTGGCAGAAATTTGACAGCTTGGTAAGATGCCATGAC CACTACCTTTGCAGGCACTGTTTAAACCTTCTGCTGTCAGTATCCG ACAGGTGTCCTCTTTGTAAATATCCATTACCAACAGATGGAAGAT ATCAACAGCCCCAAGCTCTCCACCTCCCTACGAAGAGTAACACCGT CCGGCCCCGGCCCCGACAAACAGCCAGCACAAGGGAACCGCACGT CaCCCAACGCACACAGACACAGCACCCCAACACAGAACCGCACACA CACACACACACACCCACACAGCACGCGCCCCACCACCGGGGGCC GCCCCCCCGGGGGGGGGCCCCCGGGAGCCCGGGCGGAGCCCCA CGGAGATGCCCATCAGTTCGATGTCTCGGCCACCGACCCGCCcAGC CAATCGTCGCAGGACCTCCCTTGAGTCTAAACCTGCCCCCCACTg TTTCATACATCAAAGTCTCCTAGATTTGCTAAAACAAAGTCTGCA ATCCTTAAAGGGGAACAGTCTGGCAAAGCGACAGTGGAAATCAG AGAATAGATCTGTCTATACATAGTTCTGGAGGATTAACATTATCT CTGAACCCAACAAATGTTACCAGTTCTGAATCGATGCAGGAAGAG GTTCCCAAGGACATCACTAATCTTTTCATAGCCCTCAAGTCTGCT AGAAAGACTTTTCATGTCTTGGTCTCCAGCTTCACAATGATATTTT GGACAAGGTTTCTTCCCTCAAAGGGCACCATCTTTACAGTCAG TGGCACAGGCTCCCACTCAGGTCCAACCTCTCCAAAGTCAATAGAT CTAATCCCATCCAGTATCTTTTGGAGCCCAACAACCTCAAGCTCAA GAGAATCACCAGTATCAAGGGATCTTCCATGTAATCCTCAAACCT TTCAGATCTGATATCAAGACACCATCGTTCACCTTGAAGACAGAG TCTGTCTCAGTAAGTGGAGGCATTCATCCAACATCTCTTATCTA TCTCACCCTTAAAGAGGTGAGAGCATGATAAAGTTTCAAGCCACCC TGGATTCTGTAATTTGGCACCTAACCAAGAAATCAATGAAAATTTT CTTAAACAGTCAATATTATCTGATTGTGCGTAAAGTCCACTGAAA TTGAAAATCCAAATACCCCTTTTGTGTAGTTGAGCATGTAGTCCCA CAGATCCTTTAAGGATTTAAATGCTTTGGTPTTGTTCAGGCCCTGC CTAATCAACATGGCAGCATTACACACAACATCTCCCATTCGGTAA AGAACCACCCAAACCAACTGCAAAATCATTCTTAAACATAGGCCCT TCCACATTTTTGTTCACCACCTTTGAGACAAATGATTGAAAGGGG CCCAGTGCCTCAGCACCATCTTCAGATGGCATCATTTCTTTATGAG GGAACCATGAAAAATTTGCCCTAATGTCTTGGTTGTTGCAACAAATTC TCGAACAAATGATTTCAAATACACCTGTTTTAAGAAAGTCTTTCGAG ACATCCCTCGTGCTAACAAACAATTCATCAACCAGACTGGAGTCAG ATCGCTGATGAGAATTTGGCAAGGTTCAGAAAACAGAACAGTGAATG TTCATCCCTTTTCCACTTAACAACATGAGAAATGAGTGACAAGGAT TCTGAGTTAATATCAATTTAAACACAGAGGTTCAAGGAATTTAATTC TGGGACTCCACCTCATGTTTTTTGAGCTCATGTTCAGACATAAATGG AAGAAGCTGATCTCAAAGATCTTGGGATATAGCCGCTCACAGAT TGAATCACTTGGTTCAAATTCACCTTTGTCTCCAGTAGCCTTGGAGC TCTCAGGCTTCTTGCTACATAATCACATGGGTTTAAAGTGTAAAG AGTTAGGTTCTCACTGTATTCTTCCCTTTGGTCCGTTCTGTAGG ACCCAAACACCCAACTCAAAGAGTTGCTCAATGAAATACAAATGT AGTCCCAAAGAGAGGGCTTAAAGGCATATATGATCACGGTGGGG TCTTGGATGAGACTGTTTGTCAAAAATGTACAGCGTTATACCATCC CGATTGCAAACCTCTTGTACATGATCATCTGTGGTTAGATCCTCAA GCAGCTTTTGTATATACAGATTTTCCCTATTTTTGTTTCTCACACA CCTGCTTCTTAGAGTTTGTGCAAAGGCTATAAAGCCAGATGAGATA CAACTCTGGAAAGCTGACTTGTGATTGCTTCTGACAGCAGCTTCT GTGCACCCTTGTGAATTTACTACAAAGTTTGTCTGGAGTGTCTT GATCAAATGATGGGATTTCTCTCTTGGAAAGTCACTCACTGATGGA TAAACCACCTTTTGTCTTAAACCATCCTTAATGGGAACATTTTCAT TCAAATTCACCAGTTAACATCTGCTAACTGATTCAGATCTTCTTC AAGACCGAGGAGGTCTCCCAATTGAAGAATGGCCTCCCTTTTATCT CTGTTAAATAGTCTAAGAAAAATCTTCAATAAATTCACCATTTT TGAGCTTATGATGCAGTTTCTTACAAGCTTTCTTACAACCTTTGT TTCATTAGGACACAGTTCTCAATGAGTCTTTGTATTTCTGTAACT CTAGAACCATCCAGCCAACTTTTCACATCAGTGTGGTATTTCAGTA</p>

ES 2 922 981 T3

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
		GAAATGGATCCAAAGGGAAATGGCATACTTTAGGAGGTCCAGTGT TCTCCTTTGGATACTATTAAC TAGGGAGACTGGGACGCCATTTGCG ATGGCTTGATCTGCAATTGTATCTATTTGTTTCAAAAGTTGATGTG GCTCTTTACACTTGACATTTGTGTAGCGCTGCAGATACAACTTTGT GAGAAGAGGGACTTCC TCCCCCATA CATAGAATCTAGATTTAAAT TCTGCAGCGAACCTCCAGCCACACTTTTTGGGCTGATAAATTTGT TTAACAAGCCGCTCAGATGAGATTGGAATCCAACAGGACAAGGAC TTCTCCGGATCACTTACAACCAGGTCACTCAGCC TCCATCAAAT AAAGTGATCTGATCATCACTTGATGTGTAAGCCTCTGGTCTTTCCG CAAAGATAACACCAATGCAGTAGTTGATGAACCTCTCGCTAAGCAA ACCATAGAAGTCAGAAGCATTATGCAAGATTCCTGCCCATATCA ATAAGGCTGGATATATGGGATGGCCTATCCCATTTCAAAATATT GTCTGAAAATTTCTCTCAGTAACAGTTGTTCTGAACCCCTGAGAAG TTTTAGCTTCGACTTGACATA TGATTTTCATTGCAATTCACAACA GGAAGGGGACCTCGACAAGCTTATGCATGTGCCAAGTTAACAAAG TGCTAACATGATCTTTCCCGAACGCACATACTGGTCAATCACCTAG TTTGAGATTTTGTAGAACATTAAAGAACAAAATGGGCACATCATT GGTCCCCATTTGCTGTGATCCATACTATAGTTTAAGAACCCTTCCC GCACATTTGATAGTCATTGACAAGATTGCATTTTCAAATTCCTTATC ATTTGTTTAAACAGGAGCCTGAAAAGAACTTGAAAAGACTCAAAA TAATCTTCTATTAACTTGTGAACATTTTTGTCTCAAATCTCCAA TATAGAGTTCTCTATTTCCCCAACCTGCTCTTTATAAGATAGTGC AAATTTAGCCTTCCAGAGTCAGGACCTACTGAGGTGATGATGTT GGTGATTTCTCTGAGTAGAAGCACAGATTTTTCAAAGCAGCTCA TACATTTGTCAACGACAGAGCTTTACTAAGGGACTCAGAATTA TTCCCTCTCACTGATTTCTCAGTCTTTCTCCAGTTTGTCCCAGTCA AATTTGAAATTCAGCCTTGCCTTTGCATATGCCTGTATTTCCCTG AGTACGATTTGCAATTCATTTGCAACAGAATCATCTTCATGCAAG AAACCAATCATTCTCAGAAAAGAACTTTCTACAAAGGTTTTTTGCC ATCTCATCGAGGCCACTGATCTTTAATGACTGAGGTGAAATACA AAGGTGACAGCTCTGTGGAACCTCAACAGCCTCACAGATAAATTT CATGTCAATCATTTGGTTAGACATGATGGTCAAAGTCTTCTACTAAA TGGAAAGATATTTCTGACAAGATAACTTTTCTTAAGTGAGCCATCT TCCTGT TAGAATAAGCTGTAATGATGTAGTCCCTTTTGTATTTGT AAGTTTTCTCCATCTCTTTGTGATTTGGCCCTCTTACCTCTCTGT TACCGTGCTATTTGGTGTGACCTTTTCTCGAGACTTTTGAAGA AGCTTGTCTCTTCTTCCATCAAACATATTTCTGCCAGGTTGTC TTCCGATCTCCCTGTCTCTTCTCCCTTGGAAACCGATGACCAATCTA GAGACTAAGTTGGAACCTTTATATTCATAGTCTGAGTGGCTCACT TATACTTTTGTCTTCTTACGAACTCTCCGTAATTTGACTCAACAGC ACTAACAGCAATTTGTTAAAGTCATATCCAGAAGTCGTTCTCCA TTTAGATGCTTATTAACCACCACACTTTTGTACTAGCAAGATCTA ATGCTGTCGCACATCCAGAGTTAGTCATGGGATCTAGGCTGTTTAG CTCTTCTCTCTTTGAAAATTAAGTGCCGTTGTTAAATGAAGAC ACCATTAGGCTAAAGGCTTCCAGATTAACACCTGGAGTTGATGCT GACAGTCAATTTCTTTACTAGTGAATCTCTTCAATTTGCTCATAGAA CACACATTTCTTCTCAGGAGTGATTGCTTCTTGGGTTGACAAAA AAACCAAATTGACTTTTGGGCTCAAAGAACTTTTCAAACATTTTA TCTGATCTGTTAGCCTGTGAGGGTCTCCTTTGTGATCAAATGACA CAGGTATGACACATTCACATAAATTTAAATTTGCACTCAACAAC ACCTTCTCACCAGTACCAAAAAATAGTTTTTATTAGGAATCTAAGCA GCTTATACACCACCTTCTCAGCAGGTGTGATCAGATCCTCCCTCAA CTTATCCATTAATGATGATGATGAAAATCTGACACTATTGCCATC ACCAAATATCTGACACTCTGTACCTGCTTTTGTATTTCTCTTTGTTG GGTGGTGGAGCATTAGCAACAATAGGGTCTCAGTCAACCTCAAT GTCGGTGAGACAGTCTTTCAAATCAGGACATGATCTAATCCATGAA ATCATGATGTCTATCATATTGTATAAGACCTCATCTGAAAAAATTG GTAAAAAGAACCCTTTAGGATCTGCATAGAAGGAAATTAATGACC ATCCGGGCTTGTATGGAGTAGCACCTTGAAGATTTCCAGTCTTC TGGTATAATAGTGGTATTTCTCAGAGTCCAGTTTTATTAATTTGGC AAAACACTTCTTTGCATTCTACCCTTGATATCTCAGACCCCTAT

ES 2 922 981 T3

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
		TTGATTTTGCCTTAGTCTAGCAACTGAGCTAGTTTTTCATACTGTTT GTTAAGGCCAGACAAACAGATGATAATCTTCTCAGGCTCTGTATGT TCTTCAGCTGCTCTGTGCTGGGTTGGAAATGTAATCTTCAAACCT CGTATAATACATTATCGGGTGAGCTCCAATTTTCATAAAAGTTCTCA AATTCAGTGAATGGTATGTGGCATTCTTGCTCAAGGTGTTTCAGACA GTCCGTAATGCTCGAAACTCAGTCCCACCCTAACAGGCATTTTTG AATTTTTGCAATGAACTCACTAATAGAtGCCCTAAACAATTCCTCA AAAGACACCTTTCTAAACACCTTTGACTTTTTTCTATTCCTCAAAA GTCATAATGAACTCCTCTTTTAGTGCTGTGAAAGCTTACCAGCCTATC ATTACACTACTATAGCAACAACCCACCAGTGTATTCATTTTTT AACCTTTGAATTCGACTGTTTTATCAATGAGGAAAGACACAAAA CATCCAGATTTAACTGCTCCTTCTAGTATTCACAGTTTTCAA ACTCTTGACTTTGTTTAAACATAGAGAGGAGCCTCTCATATTCAGT CTAGTCTCAGTCCCCTTTTCGTGCCCATGGGTCTCTCGAGTTATGA ATCTCATCAAAGGACAGGATTCGACTGCCTCCCTGCTTAATGTTAA GATATCATCACTATCAGCAAGGTTTTTCATAGAGCTCAGAGAATTC TTGATCAAGCCTTCAGGGTTTACTTTCTGAAAGTTTTCTTTAATT TCCACTTTCTAAATCTCTTCTAAACCTGCTGAAAAGAGAGTTTTAT TCCAAAACCCATCATCACAGCTCATGTTGGGGTTGATGCCTTCG TGGCACATCCTCATAATTTTCATCATTGTGAGTTGACCTCGCATCTT TCAGAAATTTTCATAGAGTCCATACCGGAGCGCTTGTGATAGTAGT CTTTCAAGGACTCACAGAGTCTAAAATATTCAGACTCTTCAAAGACT TTCTCATTTTGGTTAGAATACTCCAAAAGTTTGAATAAAAGGTCCTC TAAATTTGAAGTTTGGCCACTCTGGCATAAAACTATTATCATAATC ACAACGACCATCTACTATTGGAATAATGTGACACCCGCAACAGCA AGGTCTTCCCTGATGCATGCCAATTTGTTAGTGTCTCTATAAAT TCTTCTCAAACCTGGCTGGaGtGCTCCTAACAAAACACTCAAGAAG AATGAGAGAATTGTCTATCAGCTTGTAAACCATCAGGAATGATAAGT GGTAGTCTGGGCATACAATTCAGACTCCACCAAAATTTGTTTCCA CAGACTTATCGTGTGGTTGTGTGTCAGCCACTCTTGTCTGCACT GTCATTTTCAATGCAGCGTGACAGCAACTTGAGTCCCTCAATCAGA ACCATTTCTGGGTTCCTTTTCTCCAGAAAGTTGAGTTTCTGCCTTG ACAACCTCTCATCTGTTCTATATAGTTTAAACATAACTCTCTCAA TTCTGAGATGATTTTCATCCATTCGCGATCAAAAAGCCTAGGATCCT CGGTGCG
2	Segmento S del virus de la coriomeningitis linfocítica, secuencia completa (El segmento genómico es ARN, la secuencia en SEQ ID NO: 2 se muestra para el ADN; sin embargo, el intercambio de todas las timidinas ("T") en SEQ ID NO: 2 por uridinas ("U") proporciona la secuencia de ARN).	CGCACCGGGATCCTAGGCTTTTTGGATTGCGCTTTCCCTC TAGATCAACTGGGTGTGAGGCCCTATCCTACAGAAGGATG GGTGAGATTGTGACAATGTTTGGAGCTCTGCCTCACATCA TCGATGAGGTGATCAACATTGTCATTATTTGTGCTTATCGT GATCACGGGTATCAAGGCTGTCTACAATTTTGCCACCTGT GGGATATTCGCATTGATCAGTTTCTACTTCTGGCTGGCA GGTCTGTGGCATGTACGGTCTTAAGGGACCCGACATTTA CAAAGGAGTTTACCAATTTAAGTCAGTGGAGTTTGATATG TCACATCTGAACCTGACCATGCCAACGCATGTTTCAGCCA ACAACTCCACCATTACATCAGTATGGGGACTTCTGGACT AGAATTGACCTTCACCAATGATTCCATCATCAGTCACAAC TTTTGCAATCTGACCTCTGCCTTCAACAAAAGACCTTTG ACCACACACTCATGAGTATAGTTTTCGAGCTACACCTCAG TATCAGAGGGAACCTCAACTATAAGGCAGTATCCTGCGAC TTCAACAATGGCATAACCATCCAATACAACCTTGACATCT CAGATCGACAAAGTGCTCAGAGCCAGTGTAGAACCCTCAG AGGTAGAGTCCTAGATATGTTTGAAGTGCCTTCGGGGGG AAATACATGAGGAGTGGCTGGGGCTGGACAGGCTCAGATG GCAAGACCACCTGGTGTAGCCAGACGAGTTACCAATACCT GATTATACAAAATAGAACCCTGGGAAAACCACTGCACATAT GCAGGTCCCTTTTGGGATGTCCAGGATTCCTTTTCCCAAG AGAAGACTAAGTTCTTCACTAGGAGACTAGCGGGCACATT CACCTGGACTTTGTGAGACTCTTTCAGGGGTGGAGAATCCA GGTGGTTATTGCCTGACCAATGGATGATTTCTTGCTGCAG AGCTTAAGTGTTCGGGAACACAGCAGTTGCGAAATGCAA

ES 2 922 981 T3

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
		<p>TGTAATCATGATGCCGAATTCGTGACATGCTGCGACTA ATTGACTACAACAAGGCTGCTTTGAGTAAGTTCAAAGAGG ACGTAGAATCTGCCTTGCACTTATTCAAAACAACAGTGAA TTCTTTGATTTTCAGATCAACTACTGATGAGGAACCACTG AGAGATCTGATGGGGGTGCCATATTGCAATTACTCAAAGT TTTGGTACCTAGAACATGCAAAGACCGGCGAAACTAGTGT CCCCAAGTGTGGCTTGTACCAATGGTTCCTTACTTAAAT GAGACCCACTTCAGTGA'TCAAATCGAACAGGAAGCCGATA ACATGAT'TACAGAGATGTTGAGGAAGGAT'TACATAAAGAG GCAGGGGAGTACCCCCCTAGCAT'TGATGGACCTTCTGATG TTTTCCACATCTGCATATCTAGTCAGCATCTTCTGCACC TTGTCAAATACCAACACACAGGCACATAAAAGGTGGCTC ATGTCAAAGCCACCCGATTAACCAACAAAGGAATTTGT AGTTGTGGTGCATTTAAGTGCCTGGTGTAAAACCGTCT GGAAAAGACGCTGAAGAACAGCGCCTCCCTGACTCTCCAC CTCGAAAAGAGGTGGAGAGTCAGGGAGGCCAGAGGGTCTT AGAGTGTCAACAATTTGGGCCCTCAAATAATAGGTCATG TGCAGAAATGTTGTGAACAGTTTTTCAGATCTGGGAGCCTT GCTTTGGAGGGCTTTCAAATAATGATGCAGTCCATGAGTG CACAGTGCAGGGTGCATCTTTCTTCTTTTGTCCCTTAC TATTCAGTATGCATCTTACACAACCAGCCATATTTGTCC CACACTTTGTCTTCATACTCCCTCGAAGCTTCCCTGGTCA TTTCAACATCGATAAGCTTAATGTCTTCTATTTCTGTGA GTCCAGAAGCTTTCTGATGTCATCGGAGCCTTGACAGCTT AGAACCATCCCCTGCGGAAGAGCACCTATAACTGACGAGG TCAACCCGGGTTGCGCATGGAAGAGGTCGGCAAGATCCAT GCCGTGTGAGTACTTGGAACTTGTCTTGAATTGTTTTGA TCAACGGGTTCCCTGTAAAAGTGTATGAACTGCCCGTTCT GTGGTTGGAATAATGCTATTTCCACTGGATCATTAAATCT ACCTCAATGTCAATCCATGTAGGAGCGTTGGGGTCAAT CTCCCATGAGGTCTTTTAAAAGCATTGTCTGGCTGTAGC TTAAGCCACCTGAGGTGGACCTGTCTGCCAGGCGCTGG CTGGGTGAATTGAC'IGCAGGTTCTCGCTTGTGAGATCA ATTGTTGTGTTTTCCCATGCTCTCCCCAATCGATGTT TACAAGCTATGTATGGCCATCCTTCACCTGAAAGGCAAAC TTTATAGAGGATGTTTTTATAAGGGTTCCTGTCCCAACT TGGTCTGAAACAACATGTTGAGTTTTCTTTGGCCCGA GAACTGCCTTCAAGAGGTCCTCGCTGTTGCTTGGCTTGT CAAATGACTCTAACATGTTACCCCATCCAACAGGGCT GCCCTGCCTTCACGGCAGCACCAAGACTAAAGTTATAGC CAGAAATGTTGATGCTGGACTGCTGTTCAAGTATGACCC CAGAACTGGGTGCTTGTCTTTCAGCCTTCAAGATCATT AGATTTGGATAC'TGACTGTGTAAGCAAGCCAAGGTC'G TGAGCGCTTGTACAACGTCAT'TGAGCGGAGTCTGTGACTG TTTGGCCATACAAGCCATAGTTAGACTTGGCATGTGCGCA AATTGATTGTTCAAAGTGATGAGTCTTTCACATCCCAA CTCTTACCACACCCTTGCACCCTGCTGAGGCTTCTCAT CCCAACTATCTGTAGGATCTGAGATCTTTGGTCTAGTTGC TGTGTGTTAAGTTCCCATATATACCCTGAAGCCTGGG GCCTTTCAGACCTCATGATCTTGGCCTCAGCTTCTCAAG GTCAGCCCAAGAGACATCAGTTCTTCTGCACTGAGCCTC CCCCTTTCAAACATCTTCTTTGATGTTGACTTTAAAT CCACAAGAGAATGTACAGTCTGGTTGAGACTTCTGAGTCT CTGTAGGTCTTTGTCATCTCTTTTCTTCTCATGATC CTCTGAACATTTGCTGACCTCAGAGAAGTCCAACCCATTCA GAAGGTTGGTTGCATCCTAATGACAGCAGCCTTCACATC TGATGTGAAGCTCTGCAATCTCTTCTCAATGCTTGGCTC CATTGGAAGCTCTTAACCTCCTTAGACAAGGACATCTTGT TGCTCAATGGTTTCTCAAGACAAATGCGCAATCAAATGCC TAGGATCCACTGTGCG</p>

ES 2 922 981 T3

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
3	<p>Segmento S del clon 13 del virus de la coriomeningitis linfocítica, secuencia completa (GenBank: DQ361065.2) (El segmento genómico es ARN, la secuencia en SEQ ID NO: 3 se muestra para ADN; sin embargo, el intercambio de todas las timidinas ("T") en SEQ ID NO: 3 para uridinas ("U") proporciona la secuencia de ARN).</p>	<p>GCGCACCGGGGATCCTAGGCTTTTGGATTGCGCTTTCCT CTAGATCAACTGGGTGTCAGGCCCTATCCTACAGAAGGAT GGGTGAGATTGTGACAATGTTTGGAGCTCTGCCACATC ATCGATGAGGTGATCAACATTGTCATTATTGTGCTTATCG TGATCACGGGTATCAAGGCTGTCTACAATTTGCCACCTG TGGGATAATTCGCATTGATCAGTTTCCCTACTTCTGGCTGGC AGGTCTGTGGCATGTACGGTCTTAAGGGACCCGACATTT ACAAAGGAGTTTACCAATTTAAGTCAGTGGAGTTTGATA GTCACATCTGAACCTGACCATGCCCAACGCATGTTACGGC AACAACTCCCACCATTACATCAGTATGGGGACTTCTGGAC TAGAATTGACCTTCACCAATGATTCCATCATCAGTCACAA CTTTTGCAATCTGACCTCTGCCTTCAACAAAAGACCTTT GACCACACACTCATGAGTATAGTTTTCGAGCCTACACCTCA GTATCAGAGGGAACCTCCAACATAAGGCAGTATCCTGCGA CTTCAACAATGGCATAACCATCCAATACAACCTTGACATTC TCAGATGCACAAAAGTGTCTAGAGCCAGTGTAGAACCTTCA GAGGTAGAGTCTTAGATATGTTTGAAGTGCCTTCGGGGG GAAATACATGAGGAGTGGCTGGGGCTGGACAGGCTCAGAT GGCAAGACCACCTGGTGTAGCCAGACGAGTTACCAATACC TGATTATACAAAATAGAACCTGGGAAAACCACTGCACATA TGCAGGTCCCTTTGGGATGTCCAGGATTCTCCTTTCCCAA GAGAAGACTAAGTTCCTCACAGGACTAGCGGGCACAT TCACCTGGACTTGTCTAGACTCTTCAGGGGTGGAGAATCC AGGTGGTTATTGCCTGACCAATGGATGATTCTTGCTGCA GAGCTTAAGTGTTCGGGAACACAGCAGTTGCCAATGCA ATGTAATCATGATGAAGAATCTGTGACATGCTGGGACT AATTGACTACAACAAGGCTGCTTTGAGTAAGTTCAAAGAG GACGTAGAATCTGCCCTGCACTTATTCAAAACAACAGTGA ATTCTTTGATTTAGATCAACTACTGATGAGGAACCACTT GAGAGTCTGATGGGGGTGCCATATTGCAATTACTCAAAG TTTTGGTACCTAGAACATGCAAGACCGGGCAAACCTAGT TCCCAAGTGTGGCTGTGTCACCAATGGTTCTTACTTAAA TGAGACCCACTTCAGTGACCAAAATCGAACAGGAAGCCGAT AACATGATTACAGAGATGTTGAGGAAGGATTACATAAAGA GGCAGGGGAGTACCCCTTAGCATTTGATGGACCTTCTGAT GTTTTCCACATCTGCATATCTAGTCAGCATCTTCTGTCAC CTTGTCAAATAACCAACACACAGGCACATAAAAGGTGGCT CATGTCAAAGCCACACCGATTAACCAACAAGGAATTTG TAGTTGTGGTGCATTTAAGGTGCCTGGTGTAAAAACCGTC TGGAAAAGACGCTGAAGAACAGCGCCTCCCTGACTCTCCA CCTCGAAAGAGGTGGAGAGTCAAGGGAGGCCAGAGGGTCT TAGAGTGCACAACATTTGGGCCCTCAAAAATTAGGTCAT GTGGCAGAATGTTGTGAACAGTTTTCAGATCTGGGAGCCT TGCTTTGGAGGCGCTTCAAAAATGATGCAGTCCATGAGT GCACAGTGCAGGGTGTCTCTTCTTCTTTTGTCCCTTA CTATTCCAGTATGCATCTTACACAACCAGCCATATTGTG CCACACTTGTCTTCACTACTCCCTCGAAGCTTCCCTGGTC ATTTCAACATCGATAAGCTTAATGTCCTTCTTATTCTGTG AGTCCAGAAGCTTCTGATGTCATCGGAGCCTTGACAGCT TAGAACCATCCCTGCGGAAGAGCACCTATAACTGACGAG GTCACCCGGGTGCGCATTGAAGAGGTGCGCAAGATCCA TGCCGTGTGAGTACTTGAATCTTGCTGAAATGTTTTTTG ATCAACGGGTTCCTGTAAAAGTGTATGAACTGCCCGTTC TGTGGTTGGAAAATTGCTATTTCCACTGGAATCATTAAATC TACCTCAATGTCAATCCATGTAGGAGCGTTGGGGTCAAT TCCTCCATGAGGTCTTTTAAAAGCATGTCTGGCTGTAG CTTAAGCCACCTGAGGTGGACCTGTCTCCAGGCGCTG GCCTGGGTGAATGACTGCAGGTTTCTCGCTGTGAGATC AATTGTTGTGTTTTCCCATGCTCTCCCAACAATCGATGTT CTACAAGCTATGATGGCCATCCTTACCTGAAAGGCAAA CTTTATAGAGGATGTTTTTCATAAGGGTTCCTGTCCCAAC</p>

ES 2 922 981 T3

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
		<p>TTGGTCTGAAACAAACATGTTGAGTTTTCTCTGGCCCCG AGAACTGCCTTCAAGAGGTCCTCGCTGTTGCTTGGCTTGA TCAAATTTGACTCTAACATGTTACCCCATCCAACAGGGC TGCCCTGCCTTACGGCAGCACCAAGACTAAAGTTATAG CCAGAAATGTTGATGCTGGACTGCTGTTTCACTGATGACCC CCAGAACTGGGTGCTTGTCTTTCAGCCTTCAAGATCATT AAGATTTGGATACTTACTGCTGTAAAGCAAGCCAAGGCT GTGAGCGCTTGTACAACGTCATTGAGCGGAGTCTGTGACT GTTTGGCCATACAAGCCATAGTTAGACTTGGCATTGTGCC AAATTGATTGTTCAAAGTGATGAGTCTTTCACATCCCAA ACTCTTACCACACCACTTGCACCCTGCTGAGGCTTTCTCA TCCCAACTATCTGTAGGATCTGAGATCTTTGGTCTAGTTG CTGTGTTGTTAAGTTCCCATATATACCCTGAAGCCTGG GGCTTTCAGACCTCATGATCTTGGCCTCAGCTTCTCAA GGTGAGCCGCAAGAGACATCAGTTCTTCTGCACTGAGCCT CCCACTTTCAAAACATTTCTTTTGTGATGTTGACTTTAAA TCCACAAGAGAAATGTACAGTCTGGTTGAGACTTCTGAGTC TCTGTAGGTCTTTGTCATCTCTCTTTCCCTTCCCTCATGAT CCTTGAACATTTGCTGACCTCAGAGAAGTCCAACCCATTC AGAAGTTGGTTGCATCCTTAATGACAGCAGCCTTTCACAT CTGATGTGAAGCTCTGCAATTTCTTCTCAATGCTTGCGT CCATTGGAAGCTTTAACTTCTTAGACAAGGACATCTTG TTGCTCAATGGTTTCTCAAGACAAATGCGCAATCAAATGC CTAGGATCCACTGTGCG</p>
4	<p>Segmento L de la cepa MP de coriomeningitis linfocítica, secuencia completa (El segmento genómico es ARN, la secuencia en SEQ ID NO: 4 se muestra para ADN; sin embargo, el intercambio de todas las timidinas ("T") en SEQ ID NO: 4 por uridinas ("U") proporciona la secuencia de ARN).</p>	<p>GCGCACCGGGGATCCTAGGCATTTTTGTTGCGCATTTTGT TGTGTTATTTGTTGCACAGCCCTTCATCGTGGGACCTTCA CAAACAAACCAAACCACCAGCCATGGGCCAAGGCAAGTCC AAAGAGGGAAGGGATGCCAGCAATACGAGCAGAGCTGAAA TTCTGCCAGACACCACCTATCTCGGACCTCTGAACGCAA GTCATGCTGGCAGAGATTTGACAGTTTAGTCAGATGCCAT GACCACTATCTCTGCAGACACTGCCTGAACCTCCTGCTGT CAGTCTCCGACAGGTGCCCTCTCTGCAAACATCCATTGCC AACCAAACCTGAAAATATCCACGGCCCCAAGCTCTCCACCC CCTTACGAGGAGTGACGCCCCGAGCCCCAACCCGACACA AGGAGGCCACCAACACACAACGCCAACACGGAACACACACA CACACACCCACACACACATCCACACACACGCGCCCCCACA ACGGGGGCGCCCCCGGGGTTGGCCCCCGGGTGTCTGG GCGGAGCCCCACGAGAGGCCAATTAGTCGATCTCTCGA CCACCGACTTGGTCAGCCAGTCATCACAGGACTTGCCTT AAGTCTGTACTTGGCCACAACCTGTTTTCATACATCACCTG TTCTTTGACTTACTGAAACATAGCCTACAGTCTTTGAAAG TGAACCAGTCAGGCACAAGTGACAGCGGTACCAGTAGAAT GGATCTATCTATACACAACCTCTGGAGAATTGTGCTAATT TCCGACCCCTGTAGATGCTCACAGTCTTGAATCGATGTA GAAGAAGGCTCCAAGGACGTCATCAAAATTTCCATAACC CTCGAGCTCTGCCAAGAAAACCTCTCATATCCTTGGTCTCC AGTTTACAACGATGTTCTGAACAAGGCTTCTTCCCTCAA AAAGAGCACCCATTTCTCACAGTCAAGGGCACAGGCTCCCA TTCAGGCCAATCCTCTCAAAATCAAGGGATCTGATCCCG TCCAGTATTTTCTTGGCCTATCAGCTCAAGCTCAAGAG AGTCACCGAGTATCAGGGGGTCTCCATATAGTCTCAAA CTCTTCAGACCTAATGTCAAAAACACCATCGTTTACCTTG AAGATAGAGTCTGATCTCAACAGGTGGAGGCATTCGTCCA AGAACCTTCTGTCCACCTCACCTTTAAAGAGGTGAGAGCA TGATAGGAACTCAGCTACACCTGGACCTTGTAACTGGCAC TTCATAAAAAGATCAATGAAAACCTTCTCAAACAATCAG TGTATTCTGGTTGTGAGTGAAATCTACTGTAATTGAGAA CTCTAGCACTCCCTCTGTATTATTTATCATGTAATCCCAC AAGTTTCTCAAAGACTTGAATGCCTTTGGATTTGTCAAGC CTTGTTTATTAGCATGGCAGCATTGCACACAATATCTCC</p>

ES 2 922 981 T3

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
		CAATCGGTAAGAGAACCATCCAAATCCAAATTCGAAGTCA TTCTTAACATGGGCTCTCCATATTTTGTTCACACTTT TTAAGATGAATGATTTGGAAAGGCCCAATGCTTCAGCGCC ATCTTCAGATGGCATCATGCTTTATGAGGGAAACCATGAA AAACCTCCTAGAGTTCTGCTTGTGTGTACAAATTCGTGA CAAATGACTCAAATACTACTGTTTTAAAAAGTTTTTGCA GACATCCCTTGTACTAACGACAAATTCATCAACAAGGCTT GAGTCAGAGCGCTGATGGGAATTTACAAGATCAGAAAATA GAACAGTGTAGTGTTCGTCCCTCTTCCACTTAACATACATG AGAAATGAGCGATAAAGATTCTGAATTGATATCGATCAAT ACGCAAAGGTCAAGGAATTTGATTC TGGGACTCCATCTCA TGTTTTTTGAGCTCATATCAGACATGAAGGGAAGCAGCTG ATCTTCATAGATTTTAGGGTACAATCGCCTCACAGATTGG ATTACATGGTTTTAAACTTATCTTGTCTCCAGTAGCCTTG AACTCTCAGGCTTCCCTGCTACATAATCACATGGGTCAA GTGCTTGAGGCTTGAGCTTCCCTCAATCTTCCCTTTCACA GGTTGAGCTAAGACCCAAACACCCAACTCAAAGGAATTAC TCAGTGAGATGCAAAATATAGTCCCAAAGGAGGGGCTCAA GAGACTGATGTGGTCGAGTGTGCTTCTGGATGACTTTGC CTGTACAAAATGTACAACATTATGCCATCATGTCTGTGGA TTGCTGTACATGCGCATCCATAGCTAGATCCTCAAGCAC TTTTCTAATGTATAGATTTGCCCTATTTTTATTTCTCACA CATCTACTTCCCAAAGTTTTGCAAAGACCTATAAAGCCTG ATGAGATGCAACTTTGAAAGGCTGACTTATTTGATTGCTTC TGACAGCAACTTCTGTGCACCTTTGTGAACCTACTGCAG AGCTTGTCTGGAGTGTCTTGATTAATGATGGGATTTCTTT CCTCTTGAAAAGTCAATTAAGTGGATGAAACCACTTTCTG CCTCAAGACCATTTCTAATGGGAACAACATCAATCAAAATC AGCCAATTTATGTTTGCCAATTGACTTAGATCCTCTTCGA GGCCAAGGATGTTTCCCAACTGAAGAATGGCTTCCPTTTT ATCCCTATTGAAGAGGCTAAGAAGAATTTCTTCAATGAAC TCACCATTTCTGAGCTTATGATGTAGTCTCCTTACAAGCC TTCTCATGACCTTCGTTTCACTAGGACACAATTTCTCAAT AAGCCTTTGGATTCTGTAACCTCTAGAGCCATCCAACCAA TCCTTGACATCAGTATTAGTGTAAAGCAAAAATGGGTCCA AGGGAAAGTTGGCATAATTTAAGAGGCTAATGTTCTCTTT CTGGATGCAGTTTACCAATGAAACTGGAACACCATTTGCA ACAGCTTGATCGGCAATTTGATCTATTTGTTTTCACAGAGTT GGTGTGGCTCTTACACTTAACGTTGTGTAATGCTGCTGA CACAAAATTTGTTAAAAGTGGGACCTTCCCTCCACACA TAAAATCTGGATTTAAATCTGCAGCAAATCGCCCCACCA CACTTTTCGGACTGATGAACTTGTTAAGCAAGCCACTCAA ATGAGAATGAAATTCAGCAATACAAGGACTTCCCTCAGGG TCACTATCAACCAGTTCACTCAATCTCCTATCAAAATAAGG TGATCTGATCATCACTTGATGTGTAAGATTCTGGTCTCTC ACCAAAAATGACACCGATACAATAATTAATGAATCTCTCA CTGATTAAGCCGTAAAAGTCAAGGCAATTAATGTAAGATTCT CCTGTCCCATGTCAATGAGACTGCTTATATGGGAAGGCAC TATTCTTAATCAAAATATCTCGAAAGATTCTTTCAGTC ACAGTTGTCTCTGAACCCCTAAGAAGTTTCAGCTTTGATT TGATATA TGATTTCAATCATTGCATTCAACAGGAAAAGG GACCTCAACAAGTTTGTGCATGTGCCAAGTTAATAAGGTG CTGATATGATCCTTTCCGGAAACGCACATACTGGTCAATCAC CCAGTTTGAGATTTTGAAGGAGCATTAACAAACAAAATGG GCACATCATTGGCCCCATTTGCTATGATCCATACTGTAG TTCAACACCCCTCTCGCACATTTGATGGTCAATGATAGAA TTGCATTTTCAAATCTTTGTCTATTGTTAAGCATGAACC TGAGAAGAAGCTAGAAAAGACTCAAATAATCCTCTATC AATCTTGTAACATTTTTGTCTCAAATCCCAATATAAA GTTCTCTGTTTCTCCAACTGCTCTTTGTATGATAACGC AAACCTCAACCTTCCGGAATCAGGACCACTGAAGTGTAT

ES 2 922 981 T3

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
		<p>GACGTTGGTGACTCCTCTGAGTAAAAACATAAATTCCTTTA AAGCAGCACTCATGCATTTTGTCAATGATAGAGCCTTACT TAGAGACTCAGAATTACTTTCCCTTTCAC'AAATTC'AAACA TCTTCTCTAGTTTGTC'CCAGTCAA'ACTTGA'AAATTCAGAC CTTGTCTTTGCATGTGCCTGTATTTCCCTGAGTATGCATT TGCATTCATTTGCAGTAGAATCATT'TTCATACACGAAAAC CAATCACCCCTCTGAAAAAACTTCC'GCAGAGGTTT'TTTG CCATTT'CATCCAGACCACAT'TGTTCT'TTGACAGCTGAAGT GAAATACAATGGTGACAGTTC'GTAGAA'GTTCAATAGCC TCACAGATAAATTT'CATGTCATCATTGGTGAGACAAGATG GGTCAAAATCTTCCACAAGATGAAAAGAAA'TTCTGATAA GATGACCTTCC'TAAATATG'CCATTTTACCTGACAAATATA GTCTGAAGGTGATGCAATCCTTTTGTATTTTCAAA'CCCA CCTCATTTTCCCTT'CATGGTCTTCTTGCTTCTTTTCATA CCGCTTTATTTGTGGAGTTGACCTTATCTTCAAAT'CTTG AAGAACTTTGTCTTCTT'CCCCATCAAAGCATA'GTCTG CTGAGTCACCTTCTAGTTTCCAGCTTCTGTTCTTTAGA GCCGATAACCAATCTAGAGACCAACTTTGAA'ACCTTGTAC TCGTAATCTGAGTGGTCAATTTGTACTTCTGCTT'CTCA TGAAGCTCTCTGTGATCTGACTCACAGCACTAACAGCAA TTTGTAAAAATCATACTCTAGGAGCCGTTCC'CCATTTAAA TGTTTGTAAACAACCACACTTTTGTGTCTGGCAAGGTCTA ATGCTGTGACACCCAGAGTTAGT'CATGGGATCCAAGCT ATTGAGCCTCTTCTCCCTTTGAAAATCAAAGTGC'CATTG TTGAATGAGGACACCATCATGCTAAAGGC'TCCAGATTGA CACCTGGGGTTGTGCGT'GACAGTCAACTTCTTTCCAGT GAAC'TTCTCATTTGGT'CATAAAAACACACTTCTCCTCA GGGTGATTGACTCTTTAGGGTTAACAAAGAGCCAAACT CACTTTTAGGCTCAAAGAATTTCTCAAAGCATT'AAATTTG ATCTGTAGCCTATCAGGGGTTTCC'TTGTGATTAAATGA CACAGGTATGACACATTCAACATGA'ACTTGA'ACTTTGCGC TCAACAGTACC'TTTTACCAGTCCC'AAAAACAGTTTGTAT CAAAAATCTGAGCAATTTGTACTACTTTCTCAGCAGGT GTGATCAAATCCTCCTTCAACT'GTCCATCAATGATGTGG ATGAGAAGTCTGAGACAATGGCCATCACTAAATACCTAAT GTTTTGAACCTGTTTTGATTCCCTCTTTGTTGGGTGGTG AGCATGAGTAATAATAGGGTTCTCAATGCAATCTCAACAT CATCAATGCTGTCTTCAAGTCAGGACATGATCTGATCCA TGAGATCATGGTGTCAATCATGTTGTGCAACACTT'CATCT GAGAAGATTTGGTAAAAAGAACCTTTTGGGTCTGCATAAA AAGAGATTAGATGGCCATTTGGGACCTTGTATAGAA'AAACA CCTTGAGGATTCTCCAGTCTTTTGATACAGCAGGTGATAT TCCTCAGAGTCCAATTTTATCACTTGGCAAATACCTCTT TACATTCACC'ACTTGATACCTTACAGAGCCCAATTTGGTT TTGTCTTAATCTAGCAACTGA'ACTTGT'TTTCATACGTGTT GTCAAAGCTAGACAGACAGATGACAATCTTTTCAA'ACTAT GCATGTTCCCTAATTTGTTCCGTATTAGGCTGGAAATCATA ATCTTCAA'ACTTTGTATAATACATTTATAGGATGAGTCCG GACCTCATGAAATTTCTAAACTCAATAAATGGTATGTGGC ACTCATGCTCAAGATGTT'CCAGACAGACCATAGTGCCAAA ACTAAGTCCCACC'ACTGACAAGCACCTTTGAACTTTTAAA ATGAACTCATTTATGGATGTTCTAAACAAATCCTCAAGAG ATACCTTTCTATACGCTTTGACTTTCTCCTGTTCCCTTAG AAGTCTGATGAACTTCTCCTTGGTGTATGAAAGCTCACC AACCTATCATTCACTCCCATAGCAACAACCA'ACCAGT GCTTATCATTTTTTGACCCTTTGAGTTTAGACTGTTTATGAT CAACGAAGAGAGACACAAGACATCCAAATTCAGTAACTGT CTCCTCTGGTGTCAATAATTTTAAACTTTTAACTTTGT TCAACATAGAGAGGAGCCTC'CATACTCAGTGTAGTCTC ACTTCTCTCTATAACCATGGGATCTGCTGTGATAAAT CTCATCAAAGGACAGGATTCAACTGCCTCCTTGCTTAGTG</p>

ES 2 922 981 T3

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
		<p>CTGAAATGTCATCACTGTCTAGCAAGAGTCTCATAAAGCTC AGAGAATTCCTTAATTAATTTCCGGGGTTGATTTTCTGA AAACTCCTCTTGAGCTTCCCAGTTTCCAAGTCTCTTCTAA ACCTGCTGTAAAGGGAGTTTATGCCAAGAACCACATCATC GCAGTTCATGTTTGGGTTGACACCATCATGGCACATTTTC ATAATTTTCATCATGTGATAATGATCTTGCATCTTTCAAGA TTTTTCATAGAGTCTATACCGGAACGCTTATCAACAGTGGT CTTGAGAGATTCGCAAAGTCTGAAGTACTCAGATTCCTCA AAGACTTTCTCATCTTGGCTAGAATACTCTAAAAGTTTAA ACAGAAGGTCTCTGAACTTGAATTCACCCACTCTGGCAT AAAGCTGTTATCATAATCACACCGACCATCCACTATTGGG ACCAATGTGATACCCGCAATGGCAAGGTCTTCTTTGATAC AGGCTAGTTTATTTGGTGTCTCTATAAATTTCTTCTCAA ACTAGCTGGTGTGCTTCTAACGAAGCACTCAAGAAGATG AGGGAATTGTCAATCAGTTTATAACCATCAGGAATGATCA AAGGCAGTCCCAGGACACAAATCCCAGACTCTATTAGAAT TGCTCAACAGATTTATCATCATGGTTGTGTATGCAGCCG CTCTTGTCTGACTGTCTATCTCTATAACAACGCGACAAAA GTTTGAGTCCCTCTATCAATACCATTCTGGGTTCTCTTTG CCCTAAAAGTTGAGCTTCTGCCTTGACAACCTCTCATCT TGTCTATGTGGTTTAAAGCACAACCTCTCAACTCCGAAA TAGCTCATCCATTGCGCATCAAAAAGCCTAGGATCTCTCG GTGCC</p>
5	<p>Segmento S de la cepa MP de coriomeningitis linfocítica, secuencia completa (El segmento genómico es ARN, la secuencia en SEQ ID NO: 5 se muestra para ADN; sin embargo, el intercambio de todas las timidinas ("T") en SEQ ID NO: 5 por uridinas ("U") proporciona la secuencia de ARN).</p>	<p>CGCACCGGGGATCCTAGGCTTTTTGGATTGCGCTTTTCTC AGCTCCGTCTTGTGGGAGAATGGGTCAAATGTGACGATG TTTGAGGCTCTGCCTCACATCATTGATGAGGTCATTAACA TTGTATTATCGTGCTTATTATCATCACGAGCATCAAAGC TGTGTACAATTCGCCACCTGCGGGTACTTGCATTGATC AGCTTTCTTTTTCTGGCTGGCAGGTCCTGTGGAATGTATG GTCTTGATGGGCTGACATTTACAAAGGGGTTTACCGATT CAAGTCAGTGGAGTTTGACATGTCTTACCTAACCTGACG ATGCCAATGCATGTTTCGGCAACAACCTCCATCATTATA TAAGTATGGGGACTTCTGGATTGGAGTTAACCTTCAAAA TGACTCCATCATCACCCACAACCTTTGTAATCTGACTTCC GCCCTCAACAAGAGGACTTTTGACCACACACTTATGAGTA TAGTCTCAAGTCTGCACCTCAGCATTAGAGGGTCCCAG CTACAAAGCAGTGTCTGTGATTTTAACAATGGCATCACT ATTCATAACAACCTGTCAATTTCTAATGCACAGAGCGCTC TGAGTCAATGTAAGACCTTCAGGGGAGAGTCTGGATAT GTTCAGAAGTGTCTTTGGAGGAAAGTACATGAGGAGTGCC TGGGCTGGACAGGTTGAGTGGCAAGACTACTTGGTGCA GCCAGACAAACTACCAATATCTGATTATACAAAACAGGAC TTGGGAAAACCACTGCAGGTACGCAGGCCCTTTCGGAATG TCTAGAATTTCTTTCGCTCAAGAAAAGACAAGGTTTCTAA CTAGAAGGCTTGACGGCACATTCCTTGGACTTTATCAGA CTCATCAGGAGTGGAGAATCCAGGTGGTTACTGCTTGACC AAGTGGATGATCCTCGCTGCAGAGCTCAAGTGTTTTGGGA ACACAGCTGTTGCAAAGTGAATGTAATCATGATGAAGA GTTCTGTGATATGCTACGACTGATTGATTACAACAAGGCT GCTTTGAGTAAATTCAAAGAAGATGTAGAATCCGCTCTAC ATCTGTTCAAGACAACAGTGAATTTCTTTGATTTCTGATCA GCTTTTGATGAGAAATCACCTAAGAGACTTGATGGGAGTG CCATACTGCAATTACTCGAAATTTCTGGTATCTAGAGCATG CAAAGACTGGTGAGACTAGTGTCCCAAGTGTGGCTTGT CAGCAATGGTCTTATTTGAATGAAACCCATTTACAGCGAC CAAATTGAGCAGGAAGCAGATAATATGATCACAGAAATGC TGAGAAAGGACTACATAAAAAGGCAAGGGAGTACCCCTCT AGCCTTGATGGATCTATTGATGTTTTCTACATCAGCATAT TTGATCAGCATCTTTCTGCATCTTGTGAGGATACCAACAC ACAGACACATAAAGGGCGGCTCATGCCAAAACCATCG</p>

ES 2 922 981 T3

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
		<p>GTTAACCAGCAAGGGAATCTGTAGTTGTGGTGCATTTAAA GTACCAGGTGTGGAAACCACCTGGAAAAGACGCTGAACAG CAGCGCCTCCCTGACTCACCACCTCGAAAAGAGGTGGTGAG TCAGGGAGGCCAGAGGGTCTTAGAGTGTACGACATTTG GACCTCTGAAGATTAGGTCATGTGGTAGGATATTGTGGAC AGTTTTCAGGTCGGGGAGCCTGCCTTGGAGGCGCTTCA AAGATGATACAGTCCATGAGTGCACAGTGTGGGGTGACCT CTTTCTTTTTCTGTCCCTACTATTCCAGTGTGCATCTT GCATAGCCAGCCATATTTGTCCCAGACTTTGTCCCTCATAT TCTCTGAAGCTTCTTTAGTCATCTCAACATCGATGAGCT TAATGTCTCTTCTGTTTTGTGAATCTAGGAGTTTCCGTGAT GTCATCAGATCCCTGACAACCTTAGGACCATTCCCTGTGGA AGAGCACCTATTACTGAAGATGTCAGCCCAGGTTGTGCAT TGAAGAGGTCAGCAAGGTCCATGCCATGTGAGTATTTGGA GTCCTGCTTGAATTGTTTTGATCAGTGGGTTCTCTATAG AAATGTATGTACTGCCATTCTGTGGCTGAAATATTGCTA TTTCTACCGGTCATTAATCTGCCCTCAATGTCAATCCA TGTAGGAGCGTTAGGGTCAATACCTCCCATGAGGTCCTTC AGCAACATTGTTTGGCTGTAGCTTAAGCCACCTGAGGTG GGCCCGCTGCCCCAGGCGCTGGTTTGGGTGAGTTGGCCAT AGGCTCTCATTGTGTCAGATCAATTGTTGTGTTCTCCCAT GCTCTCCCTACAACCTGATGTCTACAAGCTATGTATGGCC ACCCTCCCTGAAAGACAGACTTTGTAGAGGATGTTCTC GTAAGGATTCCCTGTCTCCAACCTGATCAGAAACAAACATG TTGAGTTTCTTCTGGCCCCAAGAAGTCTTTCAGGAGAT CCTCACTGTTGCTTGGCTTAATTAAGATGGATTCCAACAT GTTACCCCATCTAACAAGGCTGCCCTGCTTTCACAGCA GCACCGAGACTGAAATGTAGCCAGATATGTTGATGCTAG ACTGCTGCTCAGTATGACTCCCAAGACTGGGTGCTTGTCT TTTGAGCCTTTCAAGGTCACTTAGGTTCCGGTACTTGACT GTGTAAGCAGCCCAAGGTCGTGAGTGTGTCACACCGT CATTGAGTGAAGTTTGTGATGTTTTGGCCATACAAGCCAT TGTTAAGCTTGGCATTGTGCCGAATTGATTGTTTTCAGAAGT GATGAGTCTTACATCCCAGACCTCACCACACCATTTG CACTGCTGAGGTCCTCCTCATTCCAACCATTTGCAGAAT CTGAGATCTTTGGTCAAGCTGTTGTGCTGTTAAGTTCCTC ATGTAGACTCCAGAAGTTAGAGGCCTTTCAGACCTCATGA TTTTAGCCTTTCAGTTTTTCAAGGTCAGCTGCAAGGGACAT CAGTTCTTCTGCACTAAGCCTCCCTACTTTTAGAACATTC TTTTGTGATGTTGACTTTAGTCCACAAGGGAATACACAG TTTGGTTGAGGCTTCTGAGTCTCTGTAATCTTTGTTCATC CCTTCTCTTTCTCATGATCCTCTGAACATTGCTCACC TCAGAGAAGTCTAATCCATTGAGAAGGCTGGTGGCATCCT TGATCACAGCAGCTTTCACATCTGATGTGAAGCCTTGAAG CTCTCTCTCAATGCCTGGGTCCATTGAAAGCTTTTAACT TCTTTGGACAGAGACATTTTGTCACTCAGTGGATTTCCAA GTCAAATGCGCAATCAAAATGCCTAGGATCCACTGTGCG</p>
6	<p>Secuencia de aminoácidos de la proteína NP de la cepa MP del LCMV</p>	<p>MSLSKEVKSFWTQALRRELQGFSDVKAIVIKDATSLLN GLDFSEVSNVQRIMRKEKRDDKDLQRLRLSNQTVVSLVDL KSTSKKNVLKVGRLSAEELMSLAADLEKLEKAKIMRSEPL TSGVYMGNLTAQQLDQRSQILQMVGMRRPQQSANGVVRVW DVKDSLLNNQFGTMPSLTMACMAKQSQTSLNDDVVQALTD LGLLYTVKYPNLSDLERLKDHPVLGVITEQQSSINISGY NFSLGAAVKAGAAALDGGNMLESILIKPNSNEDLLKAVLG AKKKLNMFVSDQVDRNPYENILYKVCLSGEGWPYIACRT SVVGRAWENTTIDLNERPMANSPKPAPGAAGPPQVGLSY SQTMLLKDLMGIDPNAPTWIDIEGRFNDPVEIAIFQPQN GQYIHFYREPTDQKQFKQDSKYSHGMDLADLFNAQPGLTS SVIGALPQGMVLSQGSDDIRKLLDSQNRDIIKLI DVEMT KEASREYEDKVDKYGWLCMKMHTGIVRDKKKKEVTPHICAL MDCIIFESASKARLPDLKTVHNILPHDLIFRGNVVTIL</p>

ES 2 922 981 T3

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
7	Secuencia de aminoácidos de la proteína GP de la cepa MP del LCMV	MGQIVTMFEALPHIIDEVINIVIIVLIIITTSIKAVYNFAT CGILALI SFLFLAGRSCGMYGLDGPDIYKGVYRFKSVEFD MSYLNLTMPNACSANNSSHYYISMGTSGLELFTTNDSIITH NFCNLTSALNKRTFDHTLMSIVSSLHLSIRGVPSYKAVSC DFNNGITIQYNLSFSNAQSALSQCKTFRGRVLDMFRATAFG GKYMRSGWGWTSGDGKTTWCSTNYQYLI IQNRTWENHCR YAGPFGMSRI LFAQEKTRFLTRRLAGTFTWTLSDSSGVEN PGGYCLTKWMI LAAELKCFNGTAVAKCNVNHDEEFCDMLR LIDYNKAALSFKEDVESALHLFKTTVNSLISDQLLMRNH LRDLMGVPCNYSKFWYLEHAKTGETSVPKCWLVSNGSYL NETHFSQIEQEADNMITEMLRKDYIKRQGSTPLALMDLL MFSTAYLISIFLHLVRIPTHRHIKGGSCP KPHRLTSKGI CSCGAFKVPVGVETTWKRR
8	Secuencia de aminoácidos de la proteína L de la cepa MP del LCMV	MDEATSELRELCLNHIEQDERLSRQKLNFLGQREPRMVL I EGLKLLSRCIEIDSADKSGC IHNHDDKSVEAILIESGIVC PGLPLIIPDGYKLIDNSLILLECVRSTPASFEKKFIEDT NKLACIKEDLAIAGITLVPIVDGRCDYDNSFMPEWVNFK RDLLFKLLEYSSQDEKVFEESEYFRLCESLKTTVDKRSGI DSMKILKDARSFHNDIIMKMCHDGVNPNMNCDDVVLGINS LYSRFRDLETGKLRSFQKINPGNLIKEFSELYETLADS DDISALSKEAVESCPLMRFITADTHGYERGSETSTEYERL LSMLNKVKSLKLLNTRRRQLNLDVLCLESLIKQSKLKG KNDKHWVGCCYGSVNDRLVSFHSTKEEFIRLLNRNRKSKA YRKVSLLEDLFRTSINEFILKVQRCLSVVGLSFGHYGLSEH LEHECHIPFIEFENFMRSCTHPIMYYTKFEDYDFQNTTEQ LRNMHSLKRLSSVCLALTNMKTSSVARLRQNQLGSVRYQ VVECKEVFCQVIKLDSEEHLLYQKTGESRCYSIQGPNG HLISFYADPKRFFLPIFSDEVLHNMIDTMI SWIRSCPDLK DSIDDVEIALRLLLLMLNPTKRNQKQVQNI RYLVMAIV SDFSSTSLMDKLEDLITPAEKVVYKLLRFLIKTVFGTGE KVLLSAKFKFMLNVSYLCHLITKETPDRLTDQIKCFEFFF EPKSEFGFFVNPKE SITPEEECVFYDQMKKFTGKEVDQQR TTPGVNLEAFSMMVSSFNNGTLIFKGEKRLNSLDPMTNSG CATALDLASNKSVVVKHLNGERLLEYDFNKLIVSAVSQI TESFMRKQKYKLNHSDYEYKVKSLVSRVIGSKETEAGKL EGDSADICFDGEEETSFFKNLEDKVNSTIKRYERSKKTNE GENEVGFENTKGLHHLQTI LSGKMAYLRKVI LSEISFHLV EDFDPSCLTNDDMKFICEA IETSTELSPLYFTSAVKEQCG LDEMAKNLCRKFSEGDWFSCKMILLQMNANAYS GK YRH MQRQGLNFKFDWKLEEDVRI SERESNSESLSKALSLTKC MSAALKNLCFYSEESPTSYSVGPDSGRLKFALSYKEQVG GNRELYIGDLRTKMFTRLIEDYFESFSSFFSGSCLNNDKE FENAILSMTINVREGLLNYSMDH SKWGPMMCPFLFLMLLQ NLKLGDDQYVRSKGDHISTLLTWHMHKLVEVFPVNVNAMM KSYIKSKLKLRLRGSETTVTERIFREYFELGIVPSHISSLI DMGQGILHNASDFYGLISERFINYCI GVI FGERPESYTSS DDQITLFDRLSELVSDPEEVLVLEFHSHLSGLLNKFI SPKSVVGRFAAEFKSRFYVWGEEVPLLTKFVSAALHNKVC KEPHQLCETIDT IADQAVANGVPVSLVNCIQKRTLDLLKY ANFPLDPFLLNTNTDVKDWDGSRGYRIQRLIEELCPSET KVMRRLVRRLLHHLKNGEFNEEFFLDL FNRDKKEAILQLG NILGLEEDLSQLANINWLNLELFLRMVLRQKVVPVSV TFQEERIPSLIKTLQNKLCSKFTRGAQKLLSEAINKSAFQ SCISSGFIGLCKTLGSRVNRKNRDNLYIRKVLEDLAMDA HVTAIHRHDGIMLYICDRQSHPEAHCDHISLLRPLLWDYI CISLNSFELGVVWLAEPVKGKNEGSSSLKHLNPCDYVAR KPESRLLLEDKISLNHVIQSVRRLYPKIYEDQLLPFMSDM SSKNMRWSPRIKFLDLCVLIDINSESLSHVVKWKRDE HYTVLFSDLVNSHQRS DSSLVDEFVVSTRDVCKNFLKQVY

ES 2 922 981 T3

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
		<p>FESFVREFFVATSRTLGFSWFPHKDMMPSSEDGAEALGPFQ SFILKVVNKNMERPMFRNDLQFGFGWFSYRLGDIVCNAAM LIKQGLTNPKAFKSLRNLWDYMINNTEGVLEFSITVDFTH NQNTDCLRKFSLIFLVKQQLQGGVAEFLSCSHLFKGEV DRRFLDECLHLRSDSIFKVNVDGVFDIRSEEFEDYMEDPL ILGDSLELELIGSRKILDGIRSLDFERIGPEWEPVPLTVR MGALFEGRSLVQNIVVKLETKDMRVFLAELEGYGNFDDVL GSLLLHRFRGTGEHLQSEISTILQELCIDRSILLVPLSLV PDWFTFKDCRLCFSSKNTVMYETVVVKYRLKKGKSCDDWL TKSVEEID</p>
9	Secuencia de aminoácidos de la proteína Z de la cepa MP del LCMV	<p>MGQGKSKEGRDASNTSRAEILPDTTYLGPLNCKSCWQRFD SLVRCHDHYLCRCLNLLLSVSDRCLPKHPLPTKLIKIST APSSPPPYEE</p>
10	Segmento L de Candid n°1 del Virus Junín	<p>GCGCACCGGGGATCCTAGGCGTAACTTCATCATATAAATCTCAGAT TCTGCTCTGAGTGTGACTTACTGCGAAGAGGCAGACAAAATGGGCAA CTGCAACGGGGCATCCAAGTCTAACCAGCCAGACTCCTCAAGAGCC ACACAGCCAGCCGAGAATTTAGGAGGGTAGCTCACAGCAGTCTAT ATGGTAGATATAACTGTAAGTGTCTGGTTTGTGATACCAATTT GATAACCTGTAATGATCACTACCTTTGTTTAAGGTGCCATCAGGGT ATGTTAAGGAATTCAGATCTCTGCAATATCTGCTGGAAGCCCCGTC CCACCACAATCACAGTACCGGTGGAGCCAACAGCACCACCACCATA GGCAGACTGCACAGGGTCAGACCCGACCCCGGGGGGCCCCCATG GGGACCCCGGTGGGGGAACCCCGGGGTGATGCGCCATTAGTCAA TGTCTTTGATCTCGACTTTGTGCTTCAGTGGCCTGCATGTCACCC TTTCAATCTGAACTGCCCTTGGGGATCTGATATCAGCAGGTCAAT AAAGATCTGCTGAATGCCACCTTGAATTTGAGAATTCACACCAGT CACCAAATTTATCAAGTGAACGGATCAACTGCTCTTTGTGTAGATC ATAACGAGGACAAAAGTCCCTTGTCTGAAATAATATGTTTTGTGAT GTTGTTTTTAGATAAGGCCATAGTTGGCTTAATAAGGTTTCCACAC TATCAATGTCCCTTAGTGTCTCAATGGCCTGACTATGACATCCCC AGACAACCTCACTCTATATGTTGACAACCTTTCATTACCTCTGTAA AAGATACCTCTTTCAAGACAAGAGGTTCTCCTGGGTATCTGGCC CAATGAGGTCATATGCATACTTGTTACTTAGTTTCAGAAATAAAGTC ACCAAAGTTGAACTTAACATGGCTCAGAATATTGTTCATATTTGTC GCAGCGTAGCCTGCATCAATAAACAAGCCAGCTAGGTCAAAGCTCT CATGGCCTGTGAACAATGGTAGGCTAGCGATAACCAGTGCACCATC CAACAATGAGTGGCTTCCCTCAGACCCAGAAAACACATTGACTCATT GCATCCACATTCAGCTCTAATTCAGGGTACCAGACATCATCCACTC CTAGTGAACCTGACAATGGTGTAACTGTACACCATCTTTCTTCTAAG TTTAAATTTTGTGCAAACTCGTGTGTGTTCTACTTGAATGATCAAT TTTAGTTTTCACAGCTTCTTGGCAAGCAACATTGCGCAACACAGTGT GCAGGTCCATCATGTCTTCTGAGGCAACAAGGAGATGTTGTCAAC AGAGACACCCCTAAGGAAAACCTTGATATTATCAAAGCTAGAAACT ACATAACCCATTGCAATGTCTTCAACAAAACATTGCTCTTGATACTT TATTATTCTTAACCTGACAAGGTAATACTGTGAGTTCAGCTAGATC TACTTGACTGTCACTTCTAGATCTAGAACTTCATTGAACCAAAAG AAGGATTTGAGACACGATGTTGACATGACTAGTGGGTTTATCATCG AAGATAAGACAACCTGCACCATGAAGTTCTGCAAACTTGTGTGG GCTGATGCCAACTTCCCAATTTGTATACTCTGACTGTCTAACATGG GCTGAAGCGCAATCACTCTGTTTCAATAATAAACATTATTATCTC TTACTTTCAATAAGTGACTTATAATCCCTAAGTTTTTCAATCATCAT GTCTAGAGCCACACAGACATCTAGAAAACCTTGAGTCTTCCACTATCC AAAGATCTGTTCACTTGAAGATCATTATAAAGGGTGCCAAATGTT CTTCAAATAGTTTGGGGTAATTTCTTCTGATAGAATGCAATACATG GTTCATGCCTAATTTGGTCTTCTATCTGTGCTACTGCTTTGGGTTTA ACAGCCCAGAAGAAATCTTATTACATAAGACCAGAGGGGGCTGTG GACTCTTAATAGCAGAAAACACCCACTCCCTAACCTACAGGCATT TGTGACACCAAGAGAAGTAATCCACAAAATTTGGTTTAGAAAAT TGGTTAACTTCTTAAAGTGATTTTGGACAGTAAATAACTTTAGGCT</p>

ES 2 922 981 T3

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
		TTCTCTCACAAATCCACAAAGACATGGCATTATTCGAGTAAATAT GTCCCTTTATATACAGAAATCCGCCTTTACCATCCCFAACACTTA CTCCTTACTCTTACAAAACCAATGAAGCCTGAGGCAACAGAAG ACTGAAATGCAGATTTGTTGATTGACTCTGCCAAGATCTTCTTAC GCCTTTTGTGAAATTTCTTGACAGCCTGGACTGTATGTCCTTATC AATGTTGGCATCTCTTCTTCTCTAACACTCTTCGACTTGTATGA GTTTGGTCTCAAGACCAACCTCAAGTCCCCAAAGCTCGCTAAATT GACCCATCTGTAGTCTAGAGTTTGTCTGATTTTCATCTTCACACAC CCGGCATATTGCAGGAATCCGGATAAAGCCTCATCCCCCTCCCTGC TTATCAAGTTGATAAGGTTTTCTCAAGATTTGCTCTCTTAAAT GTCATTGAACACTTCTCGCGCAGTTCTTTATAAACATTTGCTCC TTATCATCAGAAAAATAGCTTCAATTTTCTCTGTAGACGGTACC CTCTAGACCCATCAACCCAGTCTTTGACATCTGTTTCTCAATAGC TCCAAACGGAGTCTCTGTATCCAGAGTATCTAATCAATTTGGTTG ACTCTAATGGAAATCTTTGACACTATATGAGTGTAAACCCATTAG CAATACATGATCACAATTTGTGCTATGGTCTCTGACAGTTGTGT TGGAGTTTACACTTACGTTGTGTAGAGCAGCAGACACAAACTTG GTGAGTAAAGGAGTCTCTTACCCATGACAAAAATCTTGACTTAA ACTCAGCAACAAAGTTCCATCACACTCTTTGGGCTGATAAACTT GTTAAATTTAGAAGATAAGAATTCATGGAAGCACACCATTTCCAGC AGTTCTGCTCTTGAAGTTTCTCATCACTAAGGCAAGGAATTT TTATAAGGCTAACCTGGTCATCGCTGGAGGTATAAGTGACAGGTAT CACATCATACAATAAGTCAAGTGCATAACACAGAAATTTGTCAGTA ATTAGCCATATAAATCTGATGTGTTGTGCAAGATTTCCCTGGCCCA TGTTCCAAAGACAGACATTATATGGCTGGGGACCTGGTCCCTTGACTG CAGATACTGGTGAAPAACTCTTACCACACTAGTACAGTACAAA CCCATTAAACCFAAGATCTCTTCAATTTCCCTACACAGTAGGCTT CTGCAACATTAATTTGGAAGTTCAACGACCTTATGAAGATGCCATTT GAGAATGTTCACTACTGGTTCAGATTCACCTTTGTTCTATCTCTG GGATTTCTCAATTTCTAATGTGTACAAAAAGAAAGGAAAGTGTCTG GGCTCATAGTTGGTCCCCATTTGGAGTGGTCAATGAACAGGACAA GTCACCAATGTTAACAGCCATTTTCATATCACAGATTGCAAGTCTG AATTCCTTTTCTGAATCAAGCATGTGTATTTTCATGAACTACCCA CAGCTTCTGAGAAGTCTTCAACTAACCTGGTCAATCAGCTTAGTGT GAGGCTCCCACATACAGTCTCTATTTGAGCCAACCTGCTCCTTA TAACTTAGTCCAAATTTCAAGTTCCTGTATTTGAGCTGATGCTTG TGAAGTCTGTAGGAGTCTGCTGAATAGAAACATAAATTTCCGTAG GGCTGCATTTGTAAAAAFACTTTTGTCTAGCTTATCAGCAATGGCT TCAGAATGCTTTCCCTGGTACTAAGCCGAACCTCATCTTTAGTCT TCAGAAGTCTCACTGGAAAAGCCAAATCTAGATCTACTTCTATGCTC ATAAGTACCCAAATTTCTGATCATAATGCTTGAATTAAGAGATAC TTGAAGCATTCAAGAATTCATCTTCTTGGTAGGCTATTTGTGTCA AATTTTTTAATAACAAACCCAAAGGGCAGATGTCCTGCGGTGCTTC AAGAAAAAAGTCAATTTAAATGGAGATAGATAAACAGCATCACAT AACTCTTTATACACATCAGACCTGAGCACATCTGGATCAAAATCCT TCACCTCATGCATTGACACCTCTGCTTTAATCTCTCTCAACACTCC AAAAGGGGCCCAATGACTCAAGAGACTCTCGCTCATCAACAGAT GGATTTTTGATTTCAACTTGGTGTCTCAACTTTTGTCCCTCAC TATTAGCCATCTTGGCTAGTGTCAATTTGTACGTCAATTTCTAATACC CTCAAAGGCCCTTACTTGATCCTCTGTAAACTCTCATACATCACT GATAATTTCTTTGATTGGTTCTGGTCTTGAACCGGTGCTCACAA GACCTGTAGATTTTTAATAATTAAGTAGTCCATGGAATCAGGATC AAGATTATACCTGCCTTTTGTTTAAACCTCTCAGCCATAGTAGAA ACGCATGTTGAACAAGTTTCTCCTTATCATAAACAGAAAGAAAT TTCCAAGTTCGTCGAGCTTGGGGATTACCACACTTTTATTGCTTGA CAGATCCAGAGCTGTGCTAGTGTAGTGTAGGCTGTAGGGATTGCTT TTCAGTTCACCTGTAACCTTAAGTCTTCTCTATTGAAGAGAGAAA TGCAGAAGGACAAAATCTTTTACACACTCCTGGAATTTGAGTATC TGAGGAAGTCTTAGCCTTTTGGAAAAGAACTGTCCAATCTCTTT ATCATGGTGTCTCTTGTCCAGTGTAGACTCCCCTTAGAGGGG GGTTTACAACAACACPAATCAACTTGACTTTGGGCTCAATAAATTT

ES 2 922 981 T3

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
		<p>CTCAAAACACTTTATTTGATCTGTGTCAGGCGATCAGGTGTCTCTTTG GTTACCAAGTGACACAGATAACTAACATTTAATAGATATTTAAACC TTCTTGCAAAGTAAAGATCTGCATCTTCCCCTTCACCCAAAATTGT CTGGAAAAGTTCCACAGCCATCCTCTGAATCAGCACCTCTGATCCA GACATGCAGTCGACCCCTTAACTTTGACATCAAATCCACATGATGGA TTTGATTTGCATATGCCATCAAGAAATATCTTAGACCTTGTAATAA TGCTGGTTCCCTTTTGAAGGGGAACAGAGTACAGCTAACACTAAC AATCTTAATATTGGCCTTGTCAATGTGTCATGAGTTCGTGGCTAAAA CCAACCAGCTGGTCATTTCCCTCACACATTTCAATTAACACATCCTC CGAAAATATAGGCAGGAAAAATCTCTTTGGATCACAGTAAAAAGAG CCTTGTCTTCCAAATACCCCATGATGGATAGATAGATAGAATAGC ACCTTGACTTCTCACCTGTTTTTTGGTAAAAACAAGAGACCAAATGT ATCTTTGTGTCAGATGAAATCTTTGTACATAACTCTCTTAGTCTA ACATTCACAAAATATCTAGAATACTCTCTTTCATTGATTAACAATC GGGAGGAAAATGATGTCTTCAATCGAGTTGACCAATGCAAGGGAAA GGAGGACAAAATCCTAAATAATTTCTTCTGCTCACCTTCCACTAAG CTGCTGAATGGCTGATGTCTACAGATTTTCTCAAATTCCTTGTAA TAGTATATCTCATCACTGGTCTGTCAGAAACAAGTCCCTGAGCTAA AATCATCAAGCTATCCATATCAGGGTGTATTATTAGTTTTTCCAGC TGTGACCAGAGATCTTGATGAGAGTCTTCAATGTCTGGAACACG CTTGAACCCACTTGGGGCTGGTCATCAATTTCTTCCCTTATTAGTTT AATCGCTCCAGAAATATCTAGAAGTCTGTCATTGACTTAACATTAAC ATTTGTCCAACAATATCCCGCATTTCTTAACCTTACAATGGCAT CATCATGCGTTTTGAAAAGATCACAAAGTAAATTGAGTAAAACATA GTCCAGAAAACAGTAAAGTGTCTTCTCCTGGTGTGAAAACCTTTTGA CCTTTCATTTGTACACACGAAAGGGCTGAAGATAACACCTCT CTACAGCATCAATAGATATAGAATTTCTCATCTGACTGGCTTTCCAT GTTGAATTCATCTATTGGATGCAATGCGATAGAGTAGACTACATCC ATCAACTTGTTTGCACAAAAGGGCAGCTGGGCACATCACTGTCTT TGTGGCTTCCATAAAGATCAAGTCATTTATAAGCTTAGACTTTTG TGAATAATTTGAATTTCCCAACTGCTTGTCAAAAATCTCCTTCTTA AACCAAAACCTTAACTTTATGAGTTCTTCTCTTATGACAGATTCTC TAAATGTCTCCTTAACCCCAACAAAGAGGGATTCAATTAACCTCTC ATCATAACCCAAAGAATCTTTTTCAAGCATTTCGATGTTTTCTAAT CCCAAGCTCTGGTTTTTTTTGTGTTGGACAACTATGGATCAATCGCT GGTATTCTTGTCTTCAATATTAATCTCTTGCATAAAATTTGATTT CTTTAGGATGTCGATCAGCAACCACCGAATCTTTTCAACAACCCAA TCAGCAAGGAATCTATTGCTGTAGCTAGATCTGCCATCAACCACAG GAACCAACGTAATCCCTGCCCTTAGTAGGTCGGACTTTAGGTTTAA GAGCTTTGACATGTCACCTCTCCATTTTCTCTCAAACCTCATCAGGA TTGACCCTAACAAAGGTTTCCAATAGGATGAGTGTTTTCCCTGTGA GTTTGAAGCCATCCGGAATGACTTTTGGAAAGGTGGGACATAGTAT GCCATAGTCAGACAGGATCACATCAACAACCTTCTGATCTGAATTG ATCTGACAGGCGTGTGCCTCACAGGACTCAAGCTCTACTAAACTTG ACAGAAGTTTGAACCTTCCAACAACAGAGAGCTGGGGTATGTTG AGATAAAAAGATGTCCCTTTGGTATGCTAGCTCCTGTCTTTCTGGA AAATGCTTTCTAATAAGGCTTTTTATTTCAATTTACTGATTCCTCCA TGCTCAAGTGCCGCTTAGGATCCTCGGTGCG</p>
11	Segmento S de Candid n°1 del virus Junín	<p>GCGCACCGGGGATCCTAGGCGATTTTGGTTACGCTATAAATTGTAAC TGTTTTCTGTTTTGGACAACATCAAAAACATCCATTGCACAATGGGG CAGTTCATTAGCTTCATGCAAGAAATACCAACCTTTTTGCAGGAGG CTCTGAACATTGCTCTTGTGTCAGTCAGTCTCATTGCCATCATTAA GGGTATAGTGAACCTTGTACAAAAGTGGTTATTCCAATCTTTGTAT TTCTAGCGCTTGACAGGAAGATCCTGCACAGAAGAAGCTTTCAAAA TCGGACTGCACACTGAGTTCAGACTGTGTCCTTCTCAATGGTGGG TCTCTTTTCCAACAATCCACATGACCTACCTTTGTTGTGTAACCTTA AACAAGAGCCATCTTTACATTAAGGGGGCAATGCTTCAATTTTCA TCAGCTTTGATGATATTGCAGTATTGTTGCCACAGTATGATGTTAT AATAACAACATCCAGCAGATATGAGCTGGTGTCCAAAAGTATGAT CAAATTTGGTTGCTCAGTGGTTCATGAATGCTGTGGGACATGATT</p>

ES 2 922 981 T3

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
		GGCATCTAGACCCACCATTCTGTGTAGGAACCGTGCAAAGACAGA AGGCTTCATCTTTCAAGTCAACACCTCCAAGACTGGTGTCAATGGA AATTATGCTAAGAAGTTTAAGACTGGCATGCATCAATTATATAGAG AATATCCTGACCCTTGCTTGAATGGCAAACGTGCTTAATGAAGGC ACAACCTACCAGTTGGCCTCTCCAATGTCCACTCGACCACGTTAAC ACATTCACTTCTTTACAAGAGGTAAAAACATTCAACTTCCAAGGA GGTCTTGAAGCATTCTTCTCTGGTCTTTGACAGACTCATCCGG CAAGGATACCCCTGGAGGCTATGTCTAGAAGAGTGGATGCTCGTA GCAGCCAAAATGAAGTGTTTTGGCAATACTGCTGTAGCAAAAATGCA ATTTGAATCATGACTCTGAATTCTGTGACATGTTGAGGCTCTTTGA TTACAACAAAAATGCTATCAAACCCATAATGATGAAACTAAGAAA CAAGTAAATCTGATGGGCGAGACAATCAATGCCCTGATATCTGACA ATTTATTGATGAAAAACAAAATAGGGAACCTGATGAGTGTCCCTTA CTGCAATTACACAAAAATTTGGTATGTCAACCACACACTTTTCAGGA CAACACTCATTACCAAGGTGCTGGTTAATAAAAAACAACAGCTATT TGAACATCTGACTTCCGTAATGACTGGATATTAGAAAAGTGACTT CTTAATTCTGAAATGCTAAGCAAAGAGTATTCGGACAGGAGGGT AAAACTCCTTTGACTTTAGTTGACATCTGTATTTGGAGCACAGTAT TCTTACAGCGTCACTTCTCCTTCACTTGGTGGGTATACCTCCCA CAGACACATCAGGGGCGAAGCATGCCCTTTGCCACACAGGTTGAAC AGCTTGGGTGGTTCAGATGTGGTAAGTACCCCAATCTAAGAAAAC CAACAGTTTGGCGTAGAGGACACTAAGACCTCCTGAGGGTCCCCAC CAGCCCCGGGCACTGCCCGGGCTGGTGTGGCCCCCAGTCCCGGGCC TGGCCCGGACCTGGGGAGGCACTGCTTACAGTGCATAGGCTGCCTT CGGGAGGAACAGCAAGCTCGGTGGTAATAGAGGTGTAGGTTCCCTCC TCATAGAGCTTCCCATCTAGCACTGACTGAAACATTATGCAGTCTA GCAGAGCACAGTGTGGTTCACCTGGAGGCAACTTGAAGGGAGTATC CTTTCCCTCTTTTCTTATTGACAACCCTCCATTGTGATATTG CATAAGTACCATATTTCTCCAGACCTGTTGATCAAACTGCCTGG CTGTTCAGATGTGAGCTTAACATCAACCAGTTAAGATCTCTTCT TCCATGGAGGTCAAACAACCTCCTGATGTCATCGGATCCTTGAGTA GTCACAACCATGTCTGGAGGCAGCAAGCCGATCACGTAACTAAGAA CTCTGGCATTGCATCTTCTATGTCCCTCATTAAGATGCCGTGAGA GTGTCTGCTACCATTTTTAAACCCCTTCTCATCATGTGGTTTTCTG AAGCAGTGAATGTACTGCTTACCTGCAGGTTGGAATAATGCCATCT CAACAGGGTCAAGTGGCTGGTCTTCAATGTGAGCCAAAGGGTGT GGTGGGGTCGAGTTCCCCACTGCCTCTCTGATGACAGCTTCTTGT ATCTCTGCAAGTTAGCCAATCTCAAAATCTGACCGTTTTTTTTCCG GCTGTCTAGGACCAGCAACTGGTTTCCCTTGTGATCAATACTTGT GTTGTCCCATGACCTGCCTGTGATTTGTGATCTAGAACCAATATAA GGCCAACCATCGCCAGAAAGCAAAGTTGTACAAAAGGTTTTTCAT AAGGATTTCTATTGCCGTGGTTTCTCAATAAAATGACCTTCTCT TCGTTTTAACCTGAATGGTTGATTTTATGAGGGAAGAGAAGTTTTCT GGGGTGACTCTGATTGTTTCCAACATGTTTCCACCATCAAGAAATAG ATGCTCCAGCCTTACTGCAGCTGAAAGACTGAAAGTTGTAACCAGA AATATTGATGGAGCTTTCATCTTTAGTCACAATCTGAAGGCAGTCA TGTTCCTGAGTCAGTCTGTCAAGGTCCTTAAGTTTGGATACTTCA CAGTGTATAGAAGCCCAAGTGAAGTTAAAGCTTGTATGACACTGTT CATTGCTCACCTCCTTGAACAGTCAATGCAATGTGCAATGCA GGAACAGAGCCAAACTGATTGTTAGCTTTGAAGGGTCTTTAACAT CCCATATCCTCACCAACCAATTTCCCCAGTCCCTTGTGTGTTGAAA TCCAGTGTCTCAATACTCTGATCTTTTAGCAAGTTGTGACTGG GACAAGTTACCCATGTAACCCCTGAGAGCCTGTCTCTGTCTTCT TTATCTTGTTTTTTAAATTTCTCAAGGTCAGACGCCAACTCCATCAG TTCATCCCTCCCAGATCTCCACCTTGAAAAGTGTGTTTCGTTGA AACTCCTCATGACATGAGTCTGTCAACCTCTTTATTCAGGTCCC TCAACTGTTGAGGTCTTCTTCCCCCTTTTGTAGTCTTCTGAGTGC CCGTGCACCTGTGCCACTTGGTTGAAGTCGATGCTGTGACCAATT AGCTTGGCGTCTTCAAACATCTGACTTGCAGCTGAGTGAATT GGCTCAAACCTCTCCTTAAGGACTGAGTCCATCTAAGCTTGGAAC CTCTTGGAGTGTGCCATGCCAGAAGTTCTGGTGAATTTGATCTAG AATAGAGTTGCTCAGTGAAGTGTTAGACACTATGCCCTAGGATCCA CTGTGCG

ES 2 922 981 T3

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
12	Secuencia de aminoácidos de la proteína NP de la cepa Clon 13 del LCMV (N.º de acceso de GenBank ABC96002.1; GI:86440166)	MSLSKEVKSFWTQALRRELQSFTSDVKA AVIKDATNLLNGLDFSE VSNVQRIMRKEKRDDKDLQRLRLSLNQTVHSLVDLKSTSKKNVLKVG RLSAEELMSLAADLEKLLKAKIMRSERPQASGVYMGNLTTQQLDQRS QILQIVGMRKPPQQGASGVVRVVDVKDSSLNQQFGTMPSLTMACMA KQSQTFLNDVVQALTDLGLLYTVKYPNLNLDLERLKD KHPVLGVITE QSSINI SGYNFSLGA AVKAGAALLDGGNMLESILIKPSNSEDLLK AVLGAKRKLNMFVSDQVGD RNPYENILYKVCLSGEGWPYIACRTSI VGRAWENTTIDL TSEKPAVNSPRPAPGAAGPPQVGLSYSQTMLLKD LMGGIDPNAPTWIDIEGRFNDPVEIAIFQPQNGQFIHFYREPVDQK QFKQDSKYSHGMDLADLFNAQPGLTSSVIGALPQGMVLSQCQGSDDI RKLDSQNRKDIK LIDVEMTREASREYEDKVVDKYGWLCKMHTGIV RDKKKKEITPHCALMDCIIFESASKARLPDLKTVHNI LPHDLIFRG PNVVTL
13	Secuencia de aminoácidos de la proteína GP de la cepa Clon 13 del LCMV (N.º de acceso de GenBank ABC96001.2; GI:116563462)	MGQIVTMFEALPHIIDEVINIVIIVLIVITGIKAVYNFATCGIFAL ISFLLLAGRSCGM YGLKGPDIYKGVYQPKSVEFDMSHLNLTMPNAC SANNSHHYISMGTSGLELTF TNDISIISHNFCNLTSAFNKKTFDHTL MSIVSSLHLSIRGNSNYKAVSCDFNNGITIQYNLTFSDAQAQSQC RTFRGRVLDMFR TAFGGKYMRSGWGTGSDGKTWCQSQTSYQYLI I QNR TWENHC TYAGPFGMSRI LLSQEKTKFLTRRLAGTFTWTLS DSS GVENPGGYCLTKWMI LAELKCFGNTAVAKCNVNHDEEFCMDLRLI DYNKAALSKFKEDVESALHLFKTTVNSLISDQLLMRNHLRDLMGVP YCNYSKFWYLEHAKTGETSVPK CWLV TNGSYLNETHFS DQIEQ EAD NMI TEMLRKDYIKRQGSTPLALMDLLMFST SAYLVSIFLHLVKIPT HRHIKGGSCP KPHRLTNK GICSCGAFKVPGVKTVWKR
14	Secuencia de aminoácidos de la proteína L de la cepa Clon 13 del LCMV (N.º de acceso de GenBank ABC96004.1; GI:86440169)	MDEIISELRELCNIEQDERLSRQKLNFLGQREPRMVLIEGLKLL SRCIEIDSADKSGCTHNDKSVETIILVSGIVCPGLPLIIPDG YK LIDNSLILLECFVRSTPASFEKKFIEDTNKLACIREDLAVAGVTLV PIVDGRCDYDNSFMPEWANFKFRDLLFKLLEYSNQNEKVFESEYF RLCESLKTTIDKRS GMSMKILKDARSTHND EIMRMCHEGINPNMS CDDVVF GINSLSRFRRDLESGKLRNFQKVNPEGLIKEFSELYEN LADSDDILTL SREAVESCPLMRFITAETHGHERGSETSTEYERLLS MLNKVKSLKLLNTRRRQLLNDVLC LSSLIKQSKFKGLKNDKHWVG CCYSSVNDRLV SFHSTKEEFIRLLRNRRKSKVFRKVSFEELFRASI SEFIAKIQKCLLVVGLSFEHYGLSEHLEQECHI PFTEFENFMKIGA HPIMYYTKFEDYNFQPSTEQLKNIQSLRRLSSVCLALTN SMKTS SV ARLRQNQIGSVRYQVVECKEVFCQVIKLDSEEHLLYQKTGESSRC YSIQGPDGHLISFYADPKRFFLPIFSDEVLYNMIDIMISWIRSCPD LKDC LTDIEVALR TLLLLMLTNPTKRNQKQVSVRYLVMAIVSDF S STSLMDKLR EDLITPAEKVVYKLLRFLIKTIFGTGEKVLLSAKFKF MLNVSYLCHLITKETPDRLTDQIKCFEKFEPK SQFGFFVNPKEAI TPEEECVFYEQMKRFTSKEIDCQHTTPGVNLEAFSLMVSSFNNGTL IFKGEKKNLSLDPM TNSGCATALDLASNKSVVVKHLN GERLLEYD FNKLLVSAVSQIT ESFVRKQYKLSHSDY EYKVKLSVSR LVI GSKG EETGRSEDNLAEICFDGEEETSFFKSL EEKVNTTIARYRRGRAND KG DGEKLTNTKGLHHLQLILTGKMAHLR KVI LSEISFHLVEDFDPS CLTNDDMKFICEAVEGSTE LSPLYFTSVIKDQCGLDEMAKNLCRKF FSENDWFSCMKMILLQMNANAYSGKYRHMQRQGLNFKFDWKLEED VRI SERESNSELSKALSLTQCMSAALKNLCFYSEESPTSYTSVGP DSGRLKFALSYKEQVGGNRELYIGDLRTKMFTRLIEDYFESFSSFF SGSCLNNDKEFENA ILSMTINVREGFLNYSMDH SKWGPMMCPFLFL MFLQNLKLGDDQYVRS GKDHVSTLLTWHMHKLVEVPPFVNVAMMKS YVKS KLLKLRGSETTVTERIFRQYFEMGIVPSHISSLIDMGQGI LH NASDFYGLLSERFINYCI GVI FGERPEAYTSSDDQITLFD RRLSDL VVSDPEEVLV LLEFQSHLSGLLNKFI SPKSVAGRFAAEFKSRFYVW GEEVPLLT K FVSAALHNVKCKEPHQLCETIDTIADQAIANGVPVSL VNSIQRR TLDLLKYANFPLDPFL LNTNTDVKDWLDGSRGYRIQRLI EELCPNETKVV RKLV RKLHHLKNGEFNEEFFLDL FNRDKKEA I LQ LGDLLGLEEDLNQLADVNWLN LNMFP LRMVLRQKV VYPSVMTFQE

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
		ERIPSLIKTLQNKLCSEKFTTRGAQKLLSEAINKSAFQSCISSGFIGL CKTLGSRVNRKNRENLYIKKLEDLTDDHVTRVNRDGITLYIC DKQSHPEAHRDHICLLRPLLWDYICISLNSFELGVWVLAEPKKG NNSENLTLKHLNCPDYVARKPESSRLLEDKVNLNQVIQSVRRLYPK IFEDQLLPFMSDMSSKNMRWSPRIKFLDLCVLIDINSELSLSHVS VKWKRDEHYTVLFSDLANSHQRSDSSLVDEFVSTRDVCKNFKQV YFESFVREFVATTRLGNFWSFPHKEMMPSEDGAEALGPFQSFVSK VVNKNVERPFRNDLQFGFGWFSYRMDVVCNAAMLIRQGLTNPKA FKSLKDLWDYMLNYTKGVLEFSISVDFTHNQNTDCLRKFSLI FLV RCQLQNPVGAELLSCSHLFKGEIDRRMLDECLHLLRTDSVFKVNDG VFDIRSEEFEDYMEDPLIILGDSLELELLGSKRILDGIRSIDFERVG PEWEPVPLTVKMGALFEGRNLVQNIIVKLETKDMKVFFLAGLEGYEK ISDVLGNLFLHRFRTGEHLGSEISVILQELCIDRSILLIPLSLLP DWFAFKDCRLCFSKSRSTLMYETVGGFRFLKGRSCDDWLGGSV AED ID
15	Secuencia de aminoácidos de la proteína Z de la cepa Clon 13 del LCMV (N.º de acceso de GenBank ABC96003.1; GI:86440168)	MGQGKSREEKGTNSTNRAEILPDTTYLGPLSCKSCWQKFDLSVRCH DHYLCRHCLNLLSVSDRCPCKYPLPTRLKISTAPSSPPYEE
16	Secuencia de aminoácidos de la proteína GP de la cepa WE del LCMV	MGQIVTMFEALPHIIDEVINIVIIIVLIIITSIKAVYNFATCGILAL VSFLFLAGRSCGMVGLNGPDIYKGVYQFKSVEFDMSHLNLMPNAC SANNSHHYISMGSSGLELFTFNDSILNHNFCNLTSAFNKKTFDHTL MSIVSSHLHSIRGNSNHKAVSCDFNNGITIQYNLSFSDPQSAISQC RTFRGRVLDMFRTAFGGKYMRSGWGWAGSDGKTTWCSQTSYQYLI I QNRWENHCRYAGFFGMSRILFAQEKTKFLTRRLAGTFTWTLSDSS GVENPGGYCLTKWMI LAELKCFGNTAVAKCNVNHDEEFCMMLRLI DYNKAALSKFKQDVESALHVFKTTVNSLISDQLLMRNHLRDLMGVP YCNYSKFWYLEHAKTGETSVPKCWLVTNGSYLNETHFSQDIEQ EAD NMI TEMLRKDYIKRQGSTPLALMDLLMFST SAYLISIFLHLVKIPT HRHIKGGSCP KPHRLTNKGICSCGAFKVPVGVKTIWKRR
17	Cebador específico de WE	5' AATCGTCTCTAAGGATGGGTCAGATTGTGACAATG-3'
18	Cebador de fusión específico de WE que lleva un saliente complementario del cebador específico de WET	5' AATCGTCTCTAAGGATGGGTCAGATTGTGACAATG-3'
19	Cebador específico de WE	5' CTCGGTGATCATGTTATCTGCTTCTTGTTCGATTGA-3'
20	Cebador de fusión específico de WE complementario de la secuencia de WE	5' AATCGTCTCTTCTTATCTCCTCTTCCAGATGG-3'
21	Cebador específico para NP del LCMV	5'-GGCTCCCAGATCTGAAAAGTGT-3'
22	Cebadores específicos de NP y GP; específico de NP: igual que en la reacción de RT, específico de GP: 5'	5'-GCTGGCTTGTCACTAATGGCTC-3'

Lista de secuencias

- <110> Hookipa Biotech AG
- 5 <120> PARTÍCULAS DE ARENAVIRUS COMO VACUNAS CONTRA EL CÁNCER
- <130> 13194-017-228
- <140> TBA
- 10 <141> En la misma fecha de la presente
- <150> 62/254.654
- <151> 12-11-2015
- 15 <150> 62/254.651
- <151> 12-11-2015
- <160> 22
- 20 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 7229
- <212> ADN
- 25 <213> Secuencia Artificial

ES 2 922 981 T3

<220>

<223> Segmento L del virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) clon 13 (GenBank: DQ361066.1)

5

<400> 1

```

gcgcacccggg gatcctaggc gtttagttgc gctgtttggg tgcacaactt tcttcgtgag      60
gctgtcagaa gtggacctgg ctgatagcga tgggtcaagg caagtccaga gaggagaaag      120
gcaccaatag tacaacacag gccgaaatcc taccagatac cacctatctt ggcctttaa      180
gctgcaaatc ttgctggcag aaatttgaca gcttggtgtaag atgcatgac cactaccttt      240
gcaggcactg tttaaacctt ctgctgtcag tatccgacag gtgtcctctt tgtaaatatc      300
cattaccaac cagattgaag atatcaacag cccaagctc tccacctccc tacgaagagt      360
aacaccgtcc ggccccggcc cgcacaaaca gcccagcaca agggaaccgc acgtcaccca      420
acgcacacag acacagcacc caacacagaa cacgcacaca cacacacaca cacaccaca      480
cgcacgcgcc cccaccaccg gggggcgccc cccccgggg ggccggcccc 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
ctctgaacc aacaaatggt caccagttct gaatcgatgc aggaagaggt tccaaggac      840
atcactaatc ttttcatagc cctcaagtcc tgctagaaag actttcatgt ccttggcttc      900
cagcttcaca atgatatfff ggacaagggt tcttccttca aaaagggcac ccatctttac      960

```

ES 2 922 981 T3

agtcagtggc acaggtctcc actcaggtcc aactctctca aagtcaatag atctaataccc	1020
atccagtatt cttttggagc ccaacaactc aagctcaaga gaatcaccaa gtatcaaggg	1080
atcttccatg taatcctcaa actcttcaga tctgatatca aagacaccat cgttcacctt	1140
gaagacagag tctgtcctca gtaagtggag gcattcatcc aacattcttc tatctatctc	1200
acccttaaag aggtgagagc atgataaaaag ttcagccaca cctggattct gtaattggca	1260
cctaaccaag aatatcaatg aaaatttctt taacacagtca gtattattct gattgtgcgt	1320
aaagtccact gaaattgaaa actccaatac cccttttgtg tagttgagca tgtagtccca	1380
cagatccttt aaggatttaa atgcctttgg gtttgtcagg ccctgcctaa tcaacatggc	1440
agcattacac acaacatctc ccattcggta agagaaccac ccaaaaccaa actgcaaact	1500
attcctaaac ataggcctct ccacattttt gttcaccacc tttgagacaa atgattgaaa	1560
ggggcccagt gcctcagcac catcttcaga tggcatcatt tctttatgag ggaacatga	1620
aaaattgcct aatgtcctgg ttgttgcaac aaattctcga acaaatgatt caaaatacac	1680
ctgttttaag aagttcttgc agacatccct cgtgctaaca acaaattcat caaccagact	1740
ggagtccagat cgctgatgag aattggcaag gtcagaaaac agaacagtgt aatgttcac	1800
ccttttccac ttaacaacat gagaaatgag tgacaaggat tctgagttaa tatcaattaa	1860
aacacagagg tcaaggaatt taattctggg actccacctc atgttttttg agctcatgtc	1920
agacataaat ggaagaagct gatcctcaaa gatcctggga tatagccgcc tcacagattg	1980
aatcacttgg ttcaaattca ctttgcctc cagtagcctt gagctctcag gctttcttgc	2040
tacataatca catgggttta agtgcttaag agttaggttc tcaactgttat tcttcccttt	2100
ggtcggttct gctaggacct aaacacccaa ctcaaaagag ttgctcaatg aaatacaaat	2160
gtagtcccaa agaagaggcc ttaaaaggca tatatgatca cggtagggctt ctggatgaga	2220
ctgtttgtca caaatgtaca gcgttatacc atcccattg caaactcttg tcacatgatc	2280
atctgtggtt agatcctcaa gcagcttttt gatatacaga ttttccctat ttttgtttct	2340
cacacacctg ottcctagag 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 tatgatgcag tttccttaca agctttctta caacctttgt	2760
ttcattagga cacagttcct caatgagtct ttgtattctg taacctctag aaccatccag	2820
ccaatctttc acatcagtgt tggattcag tagaaatgga tccaaaggga aattggcata	2880

ES 2 922 981 T3

ctttaggagg tccagtgttc tcctttggat actattaact agggagactg ggacgccatt 2940
 tgcgatggct tgatctgcaa ttgatctat tgtttcacaa agttgatgtg gctctttaca 3000
 cttgacattg tgtagcgtg cagatacaaa ctttgtgaga agagggactt cctcccccca 3060
 tacatagaat ctagatttaa attctgcagc gaacctccca gccacacttt ttgggctgat 3120
 aaatttgttt aacaagccgc tcagatgaga ttggaattcc aacaggacaa ggacttcctc 3180
 cggatcaact acaaccaggt cactcagcct cctatcaaat aaagtgatct gatcatcact 3240
 tgatgtgtaa gcctctggtc tttcgccaaa gataacacca atgcagtagt tgatgaacct 3300
 ctcgctaagc aaacataga agtcagaagc attatgcaag attccctgcc coatatcaat 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 cattggtccc catttgctgt gatccatact 3660
 atagtttaag aacccttccc gcacattgat agtcattgac aagattgcat tttcaaattc 3720
 cttatcattg ttaaacagc 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 cctgagtacg catttgcaat catttgcaac agaatcatct tcatgcaaga 4140
 aaaccaatca ttctcagaaa agaactttct acaaaggttt tttgcatct catcgaggcc 4200
 aactgatct ttaatgactg aggtgaaata caaaggtagc agctctgtgg aacctcaac 4260
 agcctcacag ataaatttca tgtcatcatt ggtagacat gatgggtcaa agtcttctac 4320
 taaatggaaa gatatttctg acaagataac ttttcttaag tgagccatct tccctgtag 4380
 aataagctgt aatgatgta gtccttttgt atttgtaagt ttttctccat ctctttgtc 4440
 attggccctc ctacctctc tgtaccgtgc tattgtggtg ttgaccttt cttcgagact 4500
 tttgaagaag cttgtctctt cttctccatc aaaacatatt tctgccaggt tgtcttccga 4560
 tctccctgtc tcttctccct tggaaccgat gaccaatcta gagactaact tggaaacttt 4620
 atattcatag tctgagtggc tcaacttata cttttgtttt cttacgaaac tctccgtaat 4680
 ttgactcaca gcactaacia gcaatttgtt aaagtcatat tccagaagtc gttctccatt 4740

ES 2 922 981 T3

tagatgctta ttaaccacca cacttttggt actagcaaga tctaagtctg tcgcacatcc	4800
agagttagtc atgggatcta ggctgtttag cttcttctct cctttgaaa ttaaagtgcc	4860
gttgttaaat gaagacacca ttaggctaaa ggcttccaga ttaacacctg gagttgtatg	4920
ctgacagtca atttctttac tagtgaatct cttcatttgc tcatagaaca cacattcttc	4980
ctcaggagtg attgcttctt tggggttgac aaaaaaacca aattgacttt tgggctcaaa	5040
gaacttttca aaacatttta tctgatctgt tagcctgtca ggggtctcct ttgtgatcaa	5100
atgacacagc tatgacacat tcaacataaa tttaaatttt gcaactcaaca acaccttctc	5160
accagtacca aaaatagttt ttattaggaa tctaagcagc ttatacacca ccttctcagc	5220
agggtgatc agatctctcc tcaacttacc cattaatgat gtagatgaaa aatctgacac	5280
tattgccatc accaaatata tgacactctg tacctgcttt tgatttctct ttgttgggtt	5340
gggtgagcatt agcaacaata gggctctcag tgcaacctca atgtcgggtga gacagtcttt	5400
caaatcagga catgatctaa tccatgaaat catgatgtct atcatattgt ataagacctc	5460
atctgaaaaa attggtaaaa agaacctttt aggatctgca tagaaggaaa ttaaatgacc	5520
atccgggcct tgtatggagt agcaccttga agattctcca gtcttctcgt ataataggtg	5580
gtattcttca gagtccagtt ttattacttg gcaaaacct tctttgcatt ctaccacttg	5640
atatctcaca gacctatatt gattttgcct tagtctagca actgagctag ttttcatact	5700
gttgttaag gccagacaaa cagatgataa tcttctcagg ctctgtatgt tcttcagctg	5760
ctctgtgctg ggttggaaat tgtaatcttc aaacttcgta taatacatta tcgggtgagc	5820
tccaattttc ataaagttct caaattcagt gaatggtatg tggcattctt gctcaagggtg	5880
ttcagacagt ccgtaatgct cgaaactcag tcccaccact aacaggcatt tttgaatttt	5940
tgcaatgaac tcaactaatag atgccctaaa caattcctca aaagacacct ttctaaacac	6000
ccttgacttt tttctattcc tcaaaagtct aatgaactcc tctttagtgc tgtgaaagct	6060
taccagccta tcattcacac tactatagca acaaccacc cagtgtttat ctttttttaa	6120
ccctttgaat ttcgactggt ttatcaatga ggaaagacac aaaacatcca gatttaacaa	6180
ctgtctcctt ctagtattca acagtttcaa actcttgact ttgtttaaca tagagaggag	6240
cctctcatat tcagtgttag tctcacttcc cctttcgtgc ccatgggtct ctgcagtat	6300
gaatctcatc aaaggacagc attcgactgc ctccctgctt aatgttaaga tatcatcact	6360
atcagcaagg ttttcataga gctcagagaa ttoccttgatc aagccttcag ggtttacttt	6420
ctgaaagttt ctctttaatt tcccactttc taaatctctt ctaaacctgc tgaaaagaga	6480
gtttattcca aaaaccacat catcacagct catgttgggg ttgatgcctt cgtggcacat	6540
cctcataatt tcatcattgt gagttgacct cgcacttttc agaattttca tagagtccat	6600
accggagcgc ttgtcgatag tagtcttcag ggactcacag agtctaaaa attcagactc	6660

ES 2 922 981 T3

```

ttcaaagact ttctcatttt ggttagaata ctccaaaagt ttgaataaaa ggtctctaaa      6720
tttgaagttt gccactctg gcataaaaact attatcataa tcacaacgac catctactat      6780
tggaactaat gtgacacccg caacagcaag gtcttccctg atgcatgcca atttgtagt      6840
gtcctctata aatttcttct caaaactggc tggagtgtc 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
atcctgttct atatagttta aacataactc tctcaattct gagatgattt catccattgc      7200
gcatcaaaaa gcctaggatc ctcggtgcg                                         7229

```

```

<210> 2
<211> 3376
5 <212> ADN
   <213> Secuencia Artificial

```

```

<220>
10 <223> Segmento S del virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV)

```

```

<400> 2
cgcacccggg atcctaggct ttttgattg cgctttctc tagatcaact ggggtgcagg      60
ccctatccta cagaaggatg ggtcagattg tgacaatggt tgaggctctg cctcacatca      120
tcgatgaggt gatcaacatt gtcattattg tgcttatcgt gatcacgggt atcaaggctg      180
tctacaattt tgccacctgt gggatattcg cattgatcag tttcctactt ctggctggca      240
ggtcctgtgg catgtacggt ctttaaggac ccgacattta caaaggagt taccaattta      300
agtcagtgga gtttgatatg tcacatctga acctgacct gcccaacgca tgttcagcca      360
acaactccca ccattacatc agtatgggga cttctggact agaattgacc ttcaccaatg      420
attccatcat cagtcacaac ttttgcaatc tgacctctgc cttcaacaaa aagaccttg      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 ctttccaag      840
agaagactaa gttcttctact aggagactag cgggcacatt cacctggact ttgtcagact      900
cttcaggggt ggagaatcca ggtggttatt gcctgaccaa atggatgatt cttgctgcag      960

```

ES 2 922 981 T3

agcttaagtg tttcgggaac acagcagttg cgaaatgcaa tghtaatcat gatgccgaat	1020
tctgtgacat gctgcgacta attgactaca acaaggctgc tttgagtaag ttcaaagagg	1080
acgtagaatc tgccttgcac ttattcaaaa caacagtgaa ttctttgatt tcagatcaac	1140
tactgatgag gaaccacttg agagatctga tgggggtgcc atattgcaat tactcaaagt	1200
tttggtaacct agaacatgca aagaccggcg aaactagtgt ccccaagtgc tggcttgtca	1260
ccaatggttc ttacttaaat gagaccact tcagtgatca aatcgaacag gaagccgata	1320
acatgattac agagatggtg aggaaggatt acataaagag gcaggggagt acccccctag	1380
cattgatgga ccttctgatg ttttccacat ctgcatact agtcagcatc ttctctgacc	1440
ttgtcaaaat accaacacac aggcacataa aagggtggctc atgtccaaag ccacaccgat	1500
taaccaacaa aggaatttgt agttgtgggtg catttaaggt gcctgggtga aaaaccgtct	1560
ggaaaagacg ctgaagaaca ggcctccct gactctccac ctcgaaagag gtggagagtc	1620
agggaggccc agagggctct agagtgctac aacatttggg cctctaataa ttaggtcatg	1680
tggcagaatg ttgtgaacag ttttcagatc tgggagcctt gctttggagg cgctttcaaa	1740
aatgatgcag tccatgagtg cacagtgagg ggtgatctct ttcttctttt tgtcccttac	1800
tattccagta tgcattctac acaaccagcc atatttgtcc cacactttgt ctccatactc	1860
cctcgaagct tccctgggtca tttcaacatc gataagctta atgtccttcc tattctgtga	1920
gtccagaagc tttctgatgt catcggagcc ttgacagctt agaaccatcc cctgcggaag	1980
agcacctata actgacgagg tcaaccgggg ttgcgcattg aagaggtcgg caagatccat	2040
gccgtgtgag tacttggaaat cttgcttgaa ttgtttttga tcaacgggtt ccctgtaaaa	2100
gtgtatgaac tgcccgttct gtggttggaa aattgctatt tccactggat cattaatct	2160
accctcaatg tcaatccatg taggagcgtt ggggtcaatt cctcccatga ggtcttttaa	2220
aagcattgtc tggctgtagc ttaagccac ctgaggtgga cctgctgctc caggcgtgg	2280
cctgggtgaa ttgactgcag gtttctcgtt tgtgagatca attgttgtgt tttcccatgc	2340
tctccccaca atcgatgttc tacaagctat gtatggccat ccttcacctg aaaggcaaac	2400
tttatagagg atgttttcat aagggttctt gtccccaaact tggctgaaa caaacatgtt	2460
gagttttctc ttggccccga gaactgcctt caagaggtcc tcgctgttgc ttggcttgat	2520
caaaattgac tctaacatgt taccctcctc caacagggct gccctgcct tcacggcagc	2580
accaagacta aagttatagc cagaaatgtt gatgctggac tgctgttcag tgatgacccc	2640
cagaactggg tgcttgtctt tcagcctttc aagatcatta agatttggat acttgactgt	2700
gtaaagcaag ccaaggtctg tgagcgttg tacaacgtca ttgagcggag tctgtgactg	2760
tttggccata caagccatag ttagacttgg cattgtgcc aattgattgt tcaaaagtga	2820
tgagtctttc acatcccaaa ctcttaccac accacttgca ccctgctgag gctttctcat	2880

ES 2 922 981 T3

```

cccaactatc tgtaggatct gagatctttg gtctagttgc tgtgttgtta agttcccat      2940
atatacccct gaagcctggg gcctttcaga cctcatgatc ttggccttca gcttctcaag      3000
gtcagccgca agagacatca gttcttctgc actgagcctc cccactttca aaacattctt      3060
ctttgatgtt gactttaaat ccacaagaga atgtacagtc tggttgagac ttctgagtct      3120
ctgtaggtct ttgtcatctc tcttttcctt cctcatgatc ctctgaacat tgctgacctc      3180
agagaagtcc aaccattca gaaggttggt tgcacotta atgacagcag ccttcacatc      3240
tgatgtgaag ctctgcaatt ctcttctcaa tgcttgctgc cattggaagc tcttaacttc      3300
cttagacaag gacatcttgt tgctcaatgg tttctcaaga caaatgcgca atcaaatgcc      3360
taggatccac tgtgcg                                     3376

```

<210> 3

<211> 3377

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Segmento S del virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) clon 13 (GenBank: DQ361065.2)

<400> 3

```

gcgcaccggg 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
aggtcctgtg gcatgtacgg tcttaagga cccgacattt acaaaggagt ttaccaattt      300
aagtcagtgg agtttgatat gtcacatctg aacctgacca tgccaacgc atgttcagcc      360
aacaactccc accattacat cagtatgggg acttctggac tagaattgac cttcaccaat      420
gattccatca tcagtcacaa cttttgcaat ctgacctctg cttcaacaa aaagaccttt      480
gaccacacac tcatgagtat agtttcgagc ctacacctca gtatcagagg gaactccaac      540
tataaggcag tatcctgcga cttcaacaat ggcataacca tccaatacaa cttgacattc      600
tcagatgcac aaagtgtcga gagccagtgt agaaccttca gaggtagagt octagatatg      660
tttagaactg ccttcggggg gaaatacatg aggagtggct ggggctggac aggctcagat      720
ggcaagacca cctggtgtag ccagacgagt taccaatacc tgattataca aaatagaacc      780
tgggaaaacc actgcacata tgcaggtcct tttgggatgt ccaggattct ctttcccaa      840
gagaagacta agttcctcac taggagacta gcgggcacat tcacctggac tttgtcagac      900
tcttcagggg tggagaatcc aggtggttat tgcctgacca aatggatgat tcttgctgca      960
gagcttaagt gtttcgggaa cacagcagtt gcgaaatgca atgtaaatca tgatgaagaa     1020

```

ES 2 922 981 T3

ttctgtgaca tgctgcgact aattgactac aacaagctg ctttgagtaa gttcaaagag	1080
gacgtagaat ctgccttgca cttattcaaa acaacagtga attccttgat ttcagatcaa	1140
ctactgatga ggaaccactt gagagatctg atgggggtgc catattgcaa ttactcaaag	1200
ttttggtacc tagaacatgc aaagaccggc gaaactagtg tccccaagtg ctggcttgtc	1260
accaatggtt cttacttaaa tgagaccac ttcagtgacc aaatcgaaca ggaagccgat	1320
aacatgatta cagagatggt gaggaaggat tacataaaga ggcaggggag taccctccta	1380
gcattgatgg accttctgat gttttccaca tctgcatatc tagtcagcat cttcctgcac	1440
cttgtcaaaa taccaacaca caggcacata aaaggtggct catgtocaaa gccacaccga	1500
ttaaccaaca aaggaatttg tagttgtggt gcatttaagg tgcctggtgt aaaaaccgtc	1560
tggaaaagac gctgaagaac agcgcctccc tgactctcca cctcgaaaga ggtggagagt	1620
cagggaggcc cagaggtct tagagtgtca caacatttg gcctctaaaa attaggtcat	1680
gtggcagaat gttgtgaaca gttttcagat ctgggagcct tgctttggag gcgcttcaa	1740
aatgatgca gtccatgagt gcacagtgcg gggatgctc tttcttctt ttgtccetta	1800
ctattccagt atgcatctta caccaaccagc catatttgtc ccacacttg tcttcatact	1860
ccctcgaagc ttccctggtc atttcaacat cgataagctt aatgtccttc ctattctgtg	1920
agtccagaag ctttctgatg tcatcggagc cttgacagct tagaaccatc ccctgcgaa	1980
gagcacctat aactgacgag gtcaaccggc gttgcgatt gaagaggtcg gcaagatcca	2040
tgccgtgtga gtacttgaa tcttgcttga attgtttttg atcaacgggt tcctgtaaa	2100
agtgtatgaa ctgccgttc tgtggttga aaattgctat ttccactgga tcattaaatc	2160
taccctcaat gtcaatccat gtaggagcgt tggggccaat tcctcccatg aggtcttita	2220
aaagcattgt ctggctgtag cttaaagcca cctgaggtgg acctgctgct ccaggcgtg	2280
gcctgggtga attgactgca ggtttctcgc ttgtgagatc aattgttggt ttttcccatg	2340
ctctccccac aatcgatggt ctacaagcta tgtatggcca tccttcacct gaaaggcaaa	2400
ctttatagag gatgttttca taagggttcc tgtcccaaac ttggtctgaa acaaacatgt	2460
tgagttttct cttggccccg agaactgcct tcaagaggtc ctgctggtg cttggcttga	2520
tcaaaattga ctctaacatg ttacccccat ccaacagggc tgcccctgcc ttcacggcag	2580
caccaagact aaagttatag ccagaaatgt tgatgctgga ctgctgttca gtgatgacc	2640
ccagaactgg gtgcttctct ttcagccttt caagatcatt aagatttga tacttgactg	2700
tgtaaagcaa gccaaagtct gtgagcgtt gtacaacgtc attgagcggg gtctgtgact	2760
gtttggccat acaagccata gttagacttg gcattgtgcc aaattgattg ttcaaaagtg	2820
atgagtcttt cacatcccaa actcttacca caccacttgc accctgctga ggctttctca	2880

ES 2 922 981 T3

```

tcccaactat ctgtaggatc tgagatcttt ggtctagttg ctgtgttggt aagttcccca 2940
tatatacccc tgaagcctgg ggcctttcag acctcatgat cttggccttc agcttctcaa 3000
ggtcagccgc aagagacatc agttcttctg cactgagcct cccactttc aaaacattct 3060
tctttgatgt tgactttaaa tccacaagag aatgtacagt ctgggtgaga cttctgagtc 3120
tctgtaggtc tttgtcatct ctcttttcct tcctcatgat cctctgaaca ttgctgacct 3180
cagagaagtc caaccattc agaaggttg ttgcatcctt aatgacagca gccttcacat 3240
ctgatgtgaa gctctgcaat tctcttctca atgcttgctt ccattggaag ctcttaactt 3300
ccttagacaa ggacatcttg ttgctcaatg gtttctcaag acaaatgctc aatcaaatgc 3360
ctaggatcca ctgtgctg 3377

```

<210> 4

<211> 7205

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Segmento L de la coriomeningitis linfocítica cepa MP

<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 gtcagctggt cagagatttg acagtttagt cagatgccat 240
gaccactatc tctgcagaca ctgcctgaac ctctgctgt cagtctccga caggtgccct 300
ctctgcaaac atccattgcc aaccaaactg aaaatatcca cggccccaag ctctccaacc 360
ccttacgagg agtgacgccc cgagcccaa caccgacaca aggaggccac caacacaacg 420
cccaacacgg aacacacaca cacacacca cacacacatc cacacacacg cgccccaca 480
acgggggggc cccccgggg gtggccccc ggggtctcgg gcggagccc acggagaggc 540
caattagtcg atctcctcga ccaccgactt ggtcagccag tcatcacag acttgccctt 600
aagtctgtac ttgccacaa ctgtttcata catcacogtg ttctttgact tactgaaaca 660
tagcctacag tctttgaaag tgaaccagtc aggcacaagt gacagcggta ccagtagaat 720
ggatctatct atacacaact cttggagaat tgtgctaatt tccgaccct gtagatgctc 780
accagttctg aatcgatgta gaagaaggct cccaaggacg tcatcaaat ttccataacc 840
ctcgagctct gccaagaaaa ctctcatatc cttggtctcc agtttcacaa cgatgttctg 900
aacaaggctt cttccctcaa aaagagcacc cattctcaca gtcaagggca caggctccca 960
ttcaggccca atcctctcaa aatcaaggga tctgatccg tccagtattt tccttgagcc 1020
tatcagctca agctcaagag agtcaccgag tatcaggggg tcctccatat agtcctcaaa 1080

```

ES 2 922 981 T3

ctcttcagac ctaatgtcaa aaacaccatc gttcaccttg aagatagagt ctgatctcaa	1140
caggtggagg cattcgtcca agaaccttct gtccacctca cctttaaaga ggtgagagca	1200
tgataggaac tcagctacac ctggaccttg taactggcac ttcactaaaa agatcaatga	1260
aaacttctc aaacaatcag tgttattctg gttgtgagtg aaatctactg taattgagaa	1320
ctctagcact ccctctgtat tatttatcat gtaatccac aagtttctca aagacttgaa	1380
tgcctttgga tttgtcaagc cttgtttgat tagcatggca gcattgcaca caatatctcc	1440
caatcggtaa gagaaccatc caaatccaaa ttgcaagtca ttcctaaaca tgggcctctc	1500
catatTTTTG ttcactactt ttaagatgaa tgattggaaa ggccccaatg cttcagcgcc	1560
atcttcagat ggcacatcatg ctttatgagg gaacatgaa aaacttccta gagttctgct	1620
tgttgctaca aattctcgta caaatgactc aaaatacact tgttttataaa agtttttgca	1680
gacatccctt gtactaacga caaattcatc 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 attttagggt acaatcgcct cacagattgg attacatggt ttaaacttat	1980
cttgcctcc agtagccttg aactctcagg cttccttgct acataatcac atgggttcaa	2040
gtgcttgagg cttgagcttc cctcattctt ccctttcaca gggtcagcta agacccaaac	2100
acccaactca aaggaattac tcagtgagat gcaaatatag tcccaaagga ggggcctcaa	2160
gagactgatg tggtcgcagt gagcttctgg atgactttgc ctgtcacaaa tgtacaacat	2220
tatgccatca tgtctgtgga ttgctgtcac atgcgcatcc atagctagat cctcaagcac	2280
tttctaatg tatagattgt ccctatTTTT atttctcaca catctacttc ccaaagtttt	2340
gcaaagacct ataaagcctg atgagatgca actttgaaag gctgacttat tgattgcttc	2400
tgacagcaac ttctgtgcac ctctgtgaa cttactgcag agcttgttct ggagtgtctt	2460
gattaatgat gggattcttt cctcttgga agtcattact gatggataaa ccactttctg	2520
cctcaagacc attcttaatg ggaacaactc attcaaattc agccaattta tgtttgcaa	2580
ttgacttaga tcctcttcga ggccaaggat gtttcccaac tgaagaatgg cttccttttt	2640
atccctattg aagaggtcta agaagaattc ttcattgaa tcaccattct tgagcttatg	2700
atgtagtctc cttacaagcc ttctcatgac cttcgtttca ctaggacaca attcttcaat	2760
aagcctttgg attctgtaac ctctagagcc atccaaccaa tccttgacat cagtattagt	2820
gttaagcaaa aatgggtcca agggaaagtt ggcatatTTT aagaggtcta atgttctctt	2880
ctggatgcag tttaccaatg aaactggaac accatttgca acagcttgat cggcaattgt	2940

ES 2 922 981 T3

atctattggt tcaacagagtt ggtgtggctc tttacactta acggttgta atgctgctga	3000
cacaaatgtt gttaaaagtg ggacctcttc cccccacaca taaaatctgg atttaaattc	3060
tgcagcaaat cgtccaccca cacttttcgg actgatgaac ttgttaagca agccactcaa	3120
atgagaatga aattccagca atacaaggac ttccctcaggg tcactatcaa ccagttcact	3180
caatctccta tcaaaataagg tgatctgac atcacttgat gtgtaagatt ctggtctctc	3240
acaaaaatg acaccgatac aataattaat gaatctctca ctgattaagc cgtaaaagtc	3300
agaggcatta tgtaagattc cctgtcccat gtcaatgaga ctgcttatat ggggaaggcac	3360
tattcctaatt tcaaaaatatt ctcgaaagat tctttcagtc acagttgtct ctgaaccct	3420
aagaagtttc agctttgatt tgatatatga tttcatcatt gcattcacia caggaaaagg	3480
gacctcaaca agtttgatgca tgtgcccaagt taataagggt ctgatatgat cctttccgga	3540
acgcacatac tgggtcatcac ccagtttgag attttgaagg agcattaaaa acaaaaatgg	3600
gcacatcatt ggccccatt tgctatgac catactgtag ttcaacaacc cctctcgac	3660
attgatggtc attgatagaa ttgcattttc aaattctttg tcattgttta agcatgaacc	3720
tgagaagaag ctgaaaaag actcaaaata atcctctatc aatctttaa acatttttgt	3780
tctcaaatcc ccaatataaa gttctctgtt tctccaacc tctctttgt atgataacgc	3840
aaacttcaac cttccggaat caggaccaac tgaagtgtat gacgttggtg actcctctga	3900
gtaaaaacat aaattcttta aagcagcact catgcatttt gtcaatgata gacccctact	3960
tagagactca gaattacttt ccctttcact aattctaaca tcttcttcta gtttgccca	4020
gtcaaaactg aaattcagac cttgtctttg catgtgcctg tatttcctg agtatgcatt	4080
tgcattcatt tgcagtagaa tcattttcat acacgaaaac caatcccct ctgaaaaaaa	4140
cttctgcag aggttttttg ccatttcac cagaccacat tgttcttga cagctgaagt	4200
gaaatacaat ggtgacagtt ctgtagaagt ttcaatagcc tcacagataa atttcatgct	4260
atcattgggt agacaagatg ggtcaaaatc ttccacaaga tgaaaagaaa tttctgataa	4320
gatgacctc ottaaatatg ccattttacc tgacaatata gtctgaagggt gatgcaatcc	4380
tttgtattt tcaaacccca cctcattttc cccttcattg gtcttcttgc tctttcata	4440
ccgctttatt gtggagttga ccttatcttc taaattcttg aagaaacttg tctcttctc	4500
cccatcaaag catatgtctg ctgagtcacc ttctagtttc ccagcttctg tttctttaga	4560
gccgataacc aatctagaga ccaactttga aacctgtac tcgtaatctg agtggttcaa	4620
tttgtacttc tgctttctca tgaagctctc tgtgatctga ctacagcac taacaagcaa	4680
tttgttaaaa tcatactcta ggagccgttc ccatttaaa tgtttgttaa caaccacact	4740
tttgttgctg gcaaggctca atgctgttgc acaccagag ttagtcatgg gatccaagct	4800
attgagcctc ttctcccctt tgaaaatcaa agtgccattg ttgaatgagg acaccatcat	4860

ES 2 922 981 T3

gctaaaggcc tccagattga cacctggggt tgtgcgctga cagtcaactt ctttcccagt	4920
gaacttcttc atttggatcat aaaaaacaca ctcttcctca ggggtgattg actccttagg	4980
gttaacaaag aagccaaact cacttttagg ctcaaagaat ttctcaaagc atttaatttg	5040
atctgtcagc ctatcagggg tttcctttgt gattaatga cacaggtatg acacattcaa	5100
catgaacttg aactttgcgc tcaacagtac cttttcacca gtcccaaaaa cagttttgat	5160
caaaaatctg agcaatttgt aactactttt ctcagcaggt gtgatcaaat cctccttcaa	5220
cttgtccatc aatgatgtgg atgagaagtc tgagacaatg gccatcacta aataccta	5280
gttttgaacc tgtttttgat tcctctttgt tgggttggtg agcatgagta ataatagggt	5340
tctcaatgca atctcaacat catcaatgct gtccttcaag tcaggacatg atctgatcca	5400
tgagatcatg gtgtcaatca tgttgtgcaa cacttcatct gagaagattg gtaaaaagaa	5460
cctttttggg tctgcataaa aagagattag atggccattg ggaccttcta tagaataaca	5520
ccttgaggat tctccagtct tttgatacag caggatgat tctcagagc ccaattttat	5580
cacttggcaa aatacctctt tacattccac cacttgatac cttacagagc ccaattgggt	5640
ttgtcttaat cttagcaactg aacttgtttt catactgttt gtcaaagcta gacagacaga	5700
tgacaatctt ttcaaactat gcatgttcct taattgttcc gtattaggct ggaaatcata	5760
atcttcaaac tttgtataat acattatagg atgagttccg gacctcatga aattctcaa	5820
ctcaataaat ggtatgtggc actcatgctc aagatgttca gacagacat agtgcccaaa	5880
actaagtccc accactgaca agcacctttg aacttttaaa atgaactcat ttatggatgt	5940
tctaaacaaa tcctcaagag atacctttct atacgccttt gactttctcc tgttccttag	6000
aagtctgatg aactcttctt tgggtgctatg aaagctcacc aacctatcat tcacactccc	6060
atagcaacaa ccaaccagc gcttatcatt ttttgaccct ttgagtttag actgtttgat	6120
caacgaagag agacacaaga catccaaatt cagtaactgt ctccttctgg tgttcaataa	6180
ttttaaactt ttaactttgt tcaacataga gaggagctc tcatactcag tgctagtctc	6240
acttcctctc tcataacat gggatctctc tgtgataaat ctcatcaaag gacaggattc	6300
aactgcctcc ttgcttagtg ctgaaatgtc atcactgtca gcaagagtct cataaagctc	6360
agagaattcc ttaattaaat ttccggggtt gattttctga aaactcctct tgagcttccc	6420
agtttccaag tctcttctaa acctgctgta aaggagttt atgccaagaa ccacatcatc	6480
gcagttcatg tttgggttga caccatcatg gcacattttc ataatttcat cattgtgaaa	6540
tgatcttgca tctttcaaga ttttcataga gtctataaccg gaacgcttat caacagtgg	6600
cttgagagat tcgcaaagtc tgaagtactc agattcctca aagactttct catcttggct	6660
agaatactct aaaagtttaa acagaaggtc tctgaacttg aaattcacc actctggcat	6720

ES 2 922 981 T3

```

aaagctgtta tcataatcac accgaccatc cactattggg accaatgtga taccogcaat      6780
ggcaaggtct tctttgatac aggctagttt attggtgtcc tctataaatt tcttctcaaa      6840
actagctggt gtgcttctaa cgaagcactc aagaagaatg agggaattgt caatcagttt      6900
ataacatca ggaatgatca aaggcagtcc cgggcacaca atcccagact ctattagaat      6960
tgcctcaaca gatttatcat catggttgtg tatgcagccg ctcttgtcag 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
5 <212> ADN
   <213> Secuencia Artificial

```

```

<220>
10 <223> Segmento S de la coriomeningitis linfocítica cepa MP

```

```

<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 caggctcctgt ggaatgtatg      240
gtcttgatgg gcctgacatt taaaaagggg tttaccgatt caagtcagtg gagtttgaca      300
tgtcttacct taacctgacg atgcccaatg catgttcggc aaacaactcc catcattata      360
taagtatggg gacttctgga ttggagttaa cttcacaaa tgactccatc atcaccaca      420
acttttgtaa tctgacttcc gccctcaaca agaggacttt tgaccacaca cttatgagta      480
tagtctcaag tctgcacctc agcattagag gggctcccag ctacaaagca gtgtcctgtg      540
atthtaacaa tggcatcact attcaataca acctgtcatt ttctaagca cagagcgctc      600
tgagtcaatg taagaccttc agggggagag tcctggatat gttcagaact gcttttggag      660
gaaagtacat gaggagtggc tggggctgga caggttcaga tggcaagact acttggtgca      720
gccagacaaa ctaccaatat ctgattatac aaaacaggac ttgggaaaac cactgcaggt      780
acgcaggccc ttcggaatg tctagaattc tcttcgctca agaaaagaca aggtttctaa      840
ctagaaggct tgcaggcaca ttcacttggg ctttatcaga ctcatcagga gtggagaatc      900
cagggtggtta ctgcttgacc aagtggatga tcctcgctgc agagctcaag tgttttggga      960
acacagctgt tgcaaagtgc aatgtaaata atgatgaaga gttctgtgat atgctacgac     1020
tgattgatta caacaaggct gctttgagta aattcaaaga agatgtagaa tccgctctac     1080

```

ES 2 922 981 T3

atctgttcaa gacaacagtg aattctttga tttctgatca gcttttgatg agaaatcacc	1140
taagagactt gatgggagtg ccatactgca attactcgaa attctgggat ctagagcatg	1200
caaagactgg tgagactagt gtccccaagt gctggcttgt cagcaatggt tcttatttga	1260
atgaaaccca tttcagcgac caaattgagc aggaagcaga taatatgatc acagaaatgc	1320
tgagaaagga ctacataaaa aggcaagga gtaccctctc agccttgatg gatctattga	1380
tgttttctac atcagcatat ttgatcagca tctttctgca tcttgtagg ataccaacac	1440
acagacacat aaagggcggc tcatgcccaa aaccacatcg gttaaccagc aagggaatct	1500
gtagttgtgg tgcatttaa gtaccagtg tggaaccac ctgaaaaga cgctgaacag	1560
cagcgcctcc ctgactcacc acctcgaaag aggtggtgag tcagggaggc ccagagggtc	1620
ttagagtgtt acgacatttg gacctctgaa gattaggtca tgtggtagga tattgtggac	1680
agtttctcagg tcggggagcc ttgccttga ggcgcttca aagatgatac agtccatgag	1740
tgcacagtgt ggggtgacct ctttctttt cttgtccctc actattccag tgtgcatctt	1800
gcatagccag ccatatttgt cccagacttt gtccctcatat tctcttgaag cttctttagt	1860
catctcaaca tcgatgagct taatgtctct tctgttttgt gaacttagga gtttcctgat	1920
gtcatcagat ccctgacaac ttaggacct tccctgtgga agagcaccta ttactgaaga	1980
tgtcagccca ggttgtgcat tgaagaggtc agcaaggtcc atgccatgtg agtatttga	2040
gtcctgcttg aattgtttt gatcagtggg ttctctatag aatgtatgt actgccatt	2100
ctgtggctga aatattgcta tttctaccgg gtcattaaat ctgccctcaa tgtcaatcca	2160
tgtaggagcg ttagggctca tacctcccat gaggtccttc agcaacattg tttggtgta	2220
gcttaagccc acctgaggtg ggcccgtgc cccaggcgtt ggtttgggtg agttggccat	2280
aggcctctca tttgtcagat caattgttgt gttctcccat gctctcccta caactgatgt	2340
tctacaagct atgtatggc acccctccc tgaaagacag actttgtaga ggatgttctc	2400
gtaaggattc ctgtctcaa cctgatcaga aacaacatg ttgagtttct tcttgcccc	2460
aagaactgct ttcaggagat cctcactggt gcttggctta attaagatgg attccaacat	2520
gttaccocca tctaacaagg ctgcccctgc tttcacagca gcaccgagac tgaaattgta	2580
gccagatatg ttgatgctag actgctgctc agtgatgact cccaagactg ggtgcttgtc	2640
tttcagcctt tcaaggtcac ttaggttcgg gtacttgact gtgtaaagca gcccaaggtc	2700
tgtgagtgtc tgcacaacgt cattgagtga ggtttgtgat tgtttggcca tacaagccat	2760
tgttaagctt ggcattgtgc cgaattgatt gttcagaagt gatgagtcct tcacatccca	2820
gaccctcacc acaccatttg cactctgctg aggtctcctc attccaacca tttgcagaat	2880
ctgagatcct tggtaagct gttgtgctgt taagttcccc atgtagactc cagaagttag	2940

ES 2 922 981 T3

aggcctttca gacctcatga ttttagcctt cagtttttca aggtcagctg caagggacat 3000
 cagttcttct gcactaagcc tocctacttt tagaacattc ttttttgatg ttgacttttag 3060
 gtccacaagg gaatacacag tttggttgag gcttctgagt ctctgtaa at ctttgcacac 3120
 cctcttctct ttcctcatga tcctctgaac attgctcacc tcagagaagt ctaatccatt 3180
 cagaaggctg gtggcatcct tgatcacagc agctttcaca tctgatgtga agccttgaag 3240
 ctctctcctc aatgcctggg tccattgaaa gcttttaact tctttggaca gagacatfff 3300
 gtcactcagt ggatttccaa gtcaaatgcg caatcaaaat gcctaggatc cactgtgcg 3359

<210> 6
 <211> 558
 <212> PRT
 <213> Virus de la coriomeningitis linfocítica

<220>
 <223> Proteína NP de la cepa MP del LCMV

<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

ES 2 922 981 T3

Asp Val Lys Asp Ser Ser Leu Leu Asn Asn Gln Phe Gly Thr Met Pro
 165 170 175
 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
 Val Ser Asp Gln Val Gly Asp Arg Asn Pro Tyr Glu Asn Ile Leu Tyr
 290 295 300
 Lys Val Cys Leu Ser Gly Glu Gly Trp Pro Tyr Ile Ala Cys Arg Thr
 305 310 315 320
 Ser Val Val Gly Arg Ala Trp Glu Asn Thr Thr Ile Asp Leu Thr Asn
 325 330 335
 Glu Arg Pro Met Ala Asn Ser Pro Lys Pro Ala Pro Gly Ala Ala Gly
 340 345 350
 Pro Pro Gln Val Gly Leu Ser Tyr Ser Gln Thr Met Leu Leu Lys Asp
 355 360 365
 Leu Met Gly Gly Ile Asp Pro Asn Ala Pro Thr Trp Ile Asp Ile Glu
 370 375 380
 Gly Arg Phe Asn Asp Pro Val Glu Ile Ala Ile Phe Gln Pro Gln Asn
 385 390 395 400
 Gly Gln Tyr Ile His Phe Tyr Arg Glu Pro Thr Asp Gln Lys Gln Phe

ES 2 922 981 T3

405

410

415

Lys Gln Asp Ser Lys Tyr Ser His Gly Met Asp Leu Ala Asp Leu Phe
420 425 430

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

Gly Met Val Leu Ser Cys Gln Gly Ser Asp Asp Ile Arg Lys Leu Leu
450 455 460

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

Lys Glu Ala Ser Arg Glu Tyr Glu Asp Lys Val Trp Asp Lys Tyr Gly
485 490 495

Trp Leu Cys Lys Met His Thr Gly Ile Val Arg Asp Lys Lys Lys Lys
500 505 510

Glu Val Thr Pro His Cys Ala Leu Met Asp Cys Ile Ile Phe Glu Ser
515 520 525

Ala Ser Lys Ala Arg Leu Pro Asp Leu Lys Thr Val His Asn Ile Leu
530 535 540

Pro His Asp Leu Ile Phe Arg Gly Pro Asn Val Val Thr Leu
545 550 555

<210> 7

<211> 498

5 <212> PRT

<213> Virus de la coriomeningitis linfocítica

<220>

10 <223> Proteína GP de la cepa MP del 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

ES 2 922 981 T3

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

ES 2 922 981 T3

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

ES 2 922 981 T3

260	265	270																		
Leu	Tyr	Glu	Thr	Leu	Ala	Asp	Ser	Asp	Asp	Ile	Ser	Ala	Leu	Ser	Lys					
		275					280					285								
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							

ES 2 922 981 T3

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
530 535 540

Lys Thr Gly Glu Ser Ser Arg Cys Tyr Ser Ile Gln Gly Pro Asn Gly
545 550 555 560

His Leu Ile Ser Phe Tyr Ala Asp Pro Lys Arg Phe Phe Leu Pro Ile
565 570 575

Phe Ser Asp Glu Val Leu His Asn Met Ile Asp Thr Met Ile Ser Trp
580 585 590

Ile Arg Ser Cys Pro Asp Leu Lys Asp Ser Ile Asp Asp Val Glu Ile
595 600 605

Ala Leu Arg Thr Leu Leu Leu Leu Met Leu Thr Asn Pro Thr Lys Arg
610 615 620

Asn Gln Lys Gln Val Gln Asn Ile Arg Tyr Leu Val Met Ala Ile Val
625 630 635 640

Ser Asp Phe Ser Ser Thr Ser Leu Met Asp Lys Leu Lys Glu Asp Leu
645 650 655

Ile Thr Pro Ala Glu Lys Val Val Tyr Lys Leu Leu Arg Phe Leu Ile
660 665 670

Lys Thr Val Phe Gly Thr Gly Glu Lys Val Leu Leu Ser Ala Lys Phe
675 680 685

Lys Phe Met Leu Asn Val Ser Tyr Leu Cys His Leu Ile Thr Lys Glu
690 695 700

Thr Pro Asp Arg Leu Thr Asp Gln Ile Lys Cys Phe Glu Lys Phe Phe
705 710 715 720

Glu Pro Lys Ser Glu Phe Gly Phe Phe Val Asn Pro Lys Glu Ser Ile
725 730 735

Thr Pro Glu Glu Glu Cys Val Phe Tyr Asp Gln Met Lys Lys Phe Thr
740 745 750

Gly Lys Glu Val Asp Cys Gln Arg Thr Thr Pro Gly Val Asn Leu Glu
755 760 765

ES 2 922 981 T3

Ala Phe Ser Met Met Val Ser Ser Phe Asn Asn Gly Thr Leu Ile Phe
770 775 780

Lys Gly Glu Lys Arg Leu Asn Ser Leu Asp Pro Met Thr Asn Ser Gly
785 790 795 800

Cys Ala Thr Ala Leu Asp Leu Ala Ser Asn Lys Ser Val Val Val Asn
805 810 815

Lys His Leu Asn Gly Glu Arg Leu Leu Glu Tyr Asp Phe Asn Lys Leu
820 825 830

Leu Val Ser Ala Val Ser Gln Ile Thr Glu Ser Phe Met Arg Lys Gln
835 840 845

Lys Tyr Lys Leu Asn His Ser Asp Tyr Glu Tyr Lys Val Ser Lys Leu
850 855 860

Val Ser Arg Leu Val Ile Gly Ser Lys Glu Thr Glu Ala Gly Lys Leu
865 870 875 880

Glu Gly Asp Ser Ala Asp Ile Cys Phe Asp Gly Glu Glu Glu Thr Ser
885 890 895

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

Glu Arg Ser Lys Lys Thr Asn Glu Gly Glu Asn Glu Val Gly Phe Glu
915 920 925

Asn Thr Lys Gly Leu His His Leu Gln Thr Ile Leu Ser Gly Lys Met
930 935 940

Ala Tyr Leu Arg Lys Val Ile Leu Ser Glu Ile Ser Phe His Leu Val
945 950 955 960

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

Cys Glu Ala Ile Glu Thr Ser Thr Glu Leu Ser Pro Leu Tyr Phe Thr
980 985 990

Ser Ala Val Lys Glu Gln Cys Gly Leu Asp Glu Met Ala Lys Asn Leu
995 1000 1005

Cys Arg Lys Phe Phe Ser Glu Gly Asp Trp Phe Ser Cys Met Lys
1010 1015 1020

ES 2 922 981 T3

Met Ile Leu Leu Gln Met Asn Ala Asn Ala Tyr Ser Gly Lys Tyr
 1025 1030 1035

Arg His Met Gln Arg Gln Gly Leu Asn Phe Lys Phe Asp Trp Asp
 1040 1045 1050

Lys Leu Glu Glu Asp Val Arg Ile Ser Glu Arg Glu Ser Asn Ser
 1055 1060 1065

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

Ala Leu Lys Asn Leu Cys Phe Tyr Ser Glu Glu Ser Pro Thr Ser
 1085 1090 1095

Tyr Thr Ser Val Gly Pro Asp Ser Gly Arg Leu Lys Phe Ala Leu
 1100 1105 1110

Ser Tyr Lys Glu Gln Val Gly Gly Asn Arg Glu Leu Tyr Ile Gly
 1115 1120 1125

Asp Leu Arg Thr Lys Met Phe Thr Arg Leu Ile Glu Asp Tyr Phe
 1130 1135 1140

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

Lys Glu Phe Glu Asn Ala Ile Leu Ser Met Thr Ile Asn Val Arg
 1160 1165 1170

Glu Gly Leu Leu Asn Tyr Ser Met Asp His Ser Lys Trp Gly Pro
 1175 1180 1185

Met Met Cys Pro Phe Leu Phe Leu Met Leu Leu Gln Asn Leu Lys
 1190 1195 1200

Leu Gly Asp Asp Gln Tyr Val Arg Ser Gly Lys Asp His Ile Ser
 1205 1210 1215

Thr Leu Leu Thr Trp His Met His Lys Leu Val Glu Val Pro Phe
 1220 1225 1230

Pro Val Val Asn Ala Met Met Lys Ser Tyr Ile Lys Ser Lys Leu
 1235 1240 1245

Lys Leu Leu Arg Gly Ser Glu Thr Thr Val Thr Glu Arg Ile Phe

ES 2 922 981 T3

1250		1255		1260
Arg Glu Tyr Phe Glu Leu Gly	Ile Val Pro Ser His	Ile Ser Ser		
1265		1270		1275
Leu Ile Asp Met Gly Gln Gly	Ile Leu His Asn Ala	Ser Asp Phe		
1280		1285		1290
Tyr Gly Leu Ile Ser Glu Arg	Phe Ile Asn Tyr Cys	Ile Gly Val		
1295		1300		1305
Ile Phe Gly Glu Arg Pro Glu	Ser Tyr Thr Ser Ser	Asp Asp Gln		
1310		1315		1320
Ile Thr Leu Phe Asp Arg Arg	Leu Ser Glu Leu Val	Asp Ser Asp		
1325		1330		1335
Pro Glu Glu Val Leu Val Leu	Leu Glu Phe His Ser	His Leu Ser		
1340		1345		1350
Gly Leu Leu Asn Lys Phe Ile	Ser Pro Lys Ser Val	Val Gly Arg		
1355		1360		1365
Phe Ala Ala Glu Phe Lys Ser	Arg Phe Tyr Val Trp	Gly Glu Glu		
1370		1375		1380
Val Pro Leu Leu Thr Lys Phe	Val Ser Ala Ala Leu	His Asn Val		
1385		1390		1395
Lys Cys Lys Glu Pro His Gln	Leu Cys Glu Thr Ile	Asp Thr Ile		
1400		1405		1410
Ala Asp Gln Ala Val Ala Asn	Gly Val Pro Val Ser	Leu Val Asn		
1415		1420		1425
Cys Ile Gln Lys Arg Thr Leu	Asp Leu Leu Lys Tyr	Ala Asn Phe		
1430		1435		1440
Pro Leu Asp Pro Phe Leu Leu	Asn Thr Asn Thr Asp	Val Lys Asp		
1445		1450		1455
Trp Leu Asp Gly Ser Arg Gly	Tyr Arg Ile Gln Arg	Leu Ile Glu		
1460		1465		1470
Glu Leu Cys Pro Ser Glu Thr	Lys Val Met Arg Arg	Leu Val Arg		
1475		1480		1485

ES 2 922 981 T3

Arg Leu His His Lys Leu Lys Asn Gly Glu Phe Asn Glu Glu Phe
 1490 1495 1500

Phe Leu Asp Leu Phe Asn Arg Asp Lys Lys Glu Ala Ile Leu Gln
 1505 1510 1515

Leu Gly Asn Ile Leu Gly Leu Glu Glu Asp Leu Ser Gln Leu Ala
 1520 1525 1530

Asn Ile Asn Trp Leu Asn Leu Asn Glu Leu Phe Pro Leu Arg Met
 1535 1540 1545

Val Leu Arg Gln Lys Val Val Tyr Pro Ser Val Met Thr Phe Gln
 1550 1555 1560

Glu Glu Arg Ile Pro Ser Leu Ile Lys Thr Leu Gln Asn Lys Leu
 1565 1570 1575

Cys Ser Lys Phe Thr Arg Gly Ala Gln Lys Leu Leu Ser Glu Ala
 1580 1585 1590

Ile Asn Lys Ser Ala Phe Gln Ser Cys Ile Ser Ser Gly Phe Ile
 1595 1600 1605

Gly Leu Cys Lys Thr Leu Gly Ser Arg Cys Val Arg Asn Lys Asn
 1610 1615 1620

Arg Asp Asn Leu Tyr Ile Arg Lys Val Leu Glu Asp Leu Ala Met
 1625 1630 1635

Asp Ala His Val Thr Ala Ile His Arg His Asp Gly Ile Met Leu
 1640 1645 1650

Tyr Ile Cys Asp Arg Gln Ser His Pro Glu Ala His Cys Asp His
 1655 1660 1665

Ile Ser Leu Leu Arg Pro Leu Leu Trp Asp Tyr Ile Cys Ile Ser
 1670 1675 1680

Leu Ser Asn Ser Phe Glu Leu Gly Val Trp Val Leu Ala Glu Pro
 1685 1690 1695

Val Lys Gly Lys Asn Glu Gly Ser Ser Ser Leu Lys His Leu Asn
 1700 1705 1710

Pro Cys Asp Tyr Val Ala Arg Lys Pro Glu Ser Ser Arg Leu Leu
 1715 1720 1725

ES 2 922 981 T3

Glu Asp Lys Ile Ser Leu Asn His Val Ile Gln Ser Val Arg Arg
 1730 1735 1740
 Leu Tyr Pro Lys Ile Tyr Glu Asp Gln Leu Leu Pro Phe Met Ser
 1745 1750 1755
 Asp Met Ser Ser Lys Asn Met Arg Trp Ser Pro Arg Ile Lys Phe
 1760 1765 1770
 Leu Asp Leu Cys Val Leu Ile Asp Ile Asn Ser Glu Ser Leu Ser
 1775 1780 1785
 Leu Ile Ser His Val Val Lys Trp Lys Arg Asp Glu His Tyr Thr
 1790 1795 1800
 Val Leu Phe Ser Asp Leu Val Asn Ser His Gln Arg Ser Asp Ser
 1805 1810 1815
 Ser Leu Val Asp Glu Phe Val Val Ser Thr Arg Asp Val Cys Lys
 1820 1825 1830
 Asn Phe Leu Lys Gln Val Tyr Phe Glu Ser Phe Val Arg Glu Phe
 1835 1840 1845
 Val Ala Thr Ser Arg Thr Leu Gly Ser Phe Ser Trp Phe Pro His
 1850 1855 1860
 Lys Asp Met Met Pro Ser Glu Asp Gly Ala Glu Ala Leu Gly Pro
 1865 1870 1875
 Phe Gln Ser Phe Ile Leu Lys Val Val Asn Lys Asn Met Glu Arg
 1880 1885 1890
 Pro Met Phe Arg Asn Asp Leu Gln Phe Gly Phe Gly Trp Phe Ser
 1895 1900 1905
 Tyr Arg Leu Gly Asp Ile Val Cys Asn Ala Ala Met Leu Ile Lys
 1910 1915 1920
 Gln Gly Leu Thr Asn Pro Lys Ala Phe Lys Ser Leu Arg Asn Leu
 1925 1930 1935
 Trp Asp Tyr Met Ile Asn Asn Thr Glu Gly Val Leu Glu Phe Ser
 1940 1945 1950
 Ile Thr Val Asp Phe Thr His Asn Gln Asn Asn Thr Asp Cys Leu
 1955 1960 1965

ES 2 922 981 T3

Arg Lys Phe Ser Leu Ile Phe Leu Val Lys Cys Gln Leu Gln Gly
 1970 1975 1980

Pro Gly Val Ala Glu Phe Leu Ser Cys Ser His Leu Phe Lys Gly
 1985 1990 1995

Glu Val Asp Arg Arg Phe Leu Asp Glu Cys Leu His Leu Leu Arg
 2000 2005 2010

Ser Asp Ser Ile Phe Lys Val Asn Asp Gly Val Phe Asp Ile Arg
 2015 2020 2025

Ser Glu Glu Phe Glu Asp Tyr Met Glu Asp Pro Leu Ile Leu Gly
 2030 2035 2040

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

Gly Ile Arg Ser Leu Asp Phe Glu Arg Ile Gly Pro Glu Trp Glu
 2060 2065 2070

Pro Val Pro Leu Thr Val Arg Met Gly Ala Leu Phe Glu Gly Arg
 2075 2080 2085

Ser Leu Val Gln Asn Ile Val Val Lys Leu Glu Thr Lys Asp Met
 2090 2095 2100

Arg Val Phe Leu Ala Glu Leu Glu Gly Tyr Gly Asn Phe Asp Asp
 2105 2110 2115

Val Leu Gly Ser Leu Leu Leu His Arg Phe Arg Thr Gly Glu His
 2120 2125 2130

Leu Gln Gly Ser Glu Ile Ser Thr Ile Leu Gln Glu Leu Cys Ile
 2135 2140 2145

Asp Arg Ser Ile Leu Leu Val Pro Leu Ser Leu Val Pro Asp Trp
 2150 2155 2160

Phe Thr Phe Lys Asp Cys Arg Leu Cys Phe Ser Lys Ser Lys Asn
 2165 2170 2175

Thr Val Met Tyr Glu Thr Val Val Gly Lys Tyr Arg Leu Lys Gly
 2180 2185 2190

Lys Ser Cys Asp Asp Trp Leu Thr Lys Ser Val Val Glu Glu Ile
 2195 2200 2205

Asp

<210> 9
 <211> 90
 <212> PRT
 <213> Virus de la coriomeningitis linfocítica
 <220>

5

ES 2 922 981 T3

ccccgtgggg gaaccccggg ggtgatgccc cattagtcaa tgtctttgat ctcgactttg	480
tgcttcagtg gcttgcattg caccctttc aatctgaact gcccttgggg atctgatatc	540
agcaggtcat ttaaagatct gctgaatgcc accttgaat ttgagaattc caaccagtca	600
ccaaatztat caagtgaacg gatcaactgc tctttgtgta gatcataaac gaggacaaag	660
tcctcttgct gaataatat tgtttggat gttgttttta gataaggcca tagttggctt	720
aataaggttt ccacactatc aatgtcctct agtgctcaa tgccttgac tatgacatcc	780
ccagacaact caactctata tgttgacaac ctttcattac ctctgtaaaa gataccctct	840
ttcaagacaa gaggttctcc tgggttatct ggoccaatga ggtcatatgc atacttgta	900
cttagttcag aataaaagtc accaaagttg aacttaacat ggctcagaat attgtcatca	960
tttgtcgcag cgtagcctgc atcaataaac aagccagcta ggtcaaagct ctcatggcct	1020
gtgaacaatg gtaggctagc gataaccagt gcacatcca acaatgagtg gcttccctca	1080
gaccagaaa cacattgact cattgcatcc acattcagct ctaattcagg ggtaccgaca	1140
tcatccactc ctagtgaact gacaatggtg taactgtaca ccatctttct tctaagtta	1200
aattttgcg aaactcgtgt gtgttctact tgaatgatca attttagttt cacagcttct	1260
tggcaagcaa cattgcgcaa cacagtgtgc aggtccatca tgtcttcctg aggcaacaag	1320
gagatgttgt caacagagac accctcaagg aaaacctga tattatcaa gctagaaact	1380
acataacca ttgcaatgct ttcaacaaac attgctcttg atactttatt attcctaact	1440
gacaaggtaa aatctgtgag ttcagctaga tctacttgac tgcactctc tagatctaga	1500
acttcattga accaaaagaa ggatttgaga cacgatgtg acatgactag tgggtttatc	1560
atcgaagata agacaactg caccatgaag ttcttgcaaa cttgctgtgg gctgatgcca	1620
acttcccaat ttgtatactc tgactgtcta acatgggctg aagcgcaatc actctgtttc	1680
acaatataaa cattattatc tcttactttc aataagtgc ttataatccc taagttttca	1740
ttcatcatgt ctagagccac acagacatct agaaacttga gtcttccact atccaaagat	1800
ctgttcactt gaagatcatt cataaagggt gccaaatggt cttcaaatag tttggggtaa	1860
tttcttgcga tagaatgcaa tacatggttc atgcctaatt ggtcttctat ctgtcgtact	1920
gctttgggtt taacagccca gaagaaattc ttattacata agaccagagg ggcctgtgga	1980
ctcttaatag cagaaaacac ccaactccc aactcacagg catttgcag caccaaagag	2040
aagtaatccc acaaaattg ttagaaaat tggtaactt ctttaagtga tttttgacag	2100
taaataactt taggctttct ctcaaaaatt ccacaaagac atggcattat togagtaaat	2160
atgtccttta tatacagaaa tccgccttta ccatccctaa cacacttact cccatactc	2220
ttacaaaacc caatgaagcc tgaggcaaca gaagactgaa atgcagattt gttgattgac	2280

ES 2 922 981 T3

tctgccaaga tcttcttcac gccttttgtg aaatttcttg acagcctgga ctgtattgtc	2340
cttatcaatg ttggcatctc ttctttctct aacactcttc gacttgtcat gagtttggtc	2400
ctcaagacca acctcaagtc cccaaagctc gctaaattga cccatctgta gtctagagtt	2460
tgtctgattt catcttcaact acaccggca tattgcagga atccggataa agcctcatcc	2520
cctcccctgc ttatcaagtt gataaggttt tcctcaaaga ttttgcctct cttaatgtca	2580
ttgaacactt tcctcgcgca gttccttata aacattgtct ccttatcatc agaaaaata	2640
gcttcaattt tcctctgtag acggtaccct ctagaccat caaccagtc tttgacatct	2700
tgttcttcaa tagctccaaa cggagtctct ctgtatccag agtatctaat caattggttg	2760
actctaattg aaatcttga cactatatga gtgctaacc cattagcaat acattgatca	2820
caaattgtgt ctatggtctc tgacagtgtt gttggagttt tacacttaac gttgtgtaga	2880
gcagcagaca caaacttggg gagtaaagga gtctcttcac ccatgacaaa aaatcttgac	2940
ttaaactcag caacaaaagt tcctatcaca ctctttgggc tgataaactt gtttaattta	3000
gaagataaga attcatggaa gcacaccatt tccagcagtt ctgtcctgtc ttgaaacttt	3060
tcatcactaa ggcaaggaat ttttataagg ctaacctggg catcgctgga ggtataagtg	3120
acaggtatca catcatacaa taagtcaagt gcataacaca gaaattgttc agtaattagc	3180
ccatataaat ctgatgtggt gtgcaagatt ccctggccca tgtccaagac agacattata	3240
tggctgggga cctggtccct tgactgcaga tactggtgaa aaaactcttc accaacacta	3300
gtacagtcac aaccattaa acctaaagat ctcttcaatt tcctacaca gtaggcttct	3360
gcaacattaa ttggaacttc aacgacctta tgaagatgcc atttgagaat gttcattact	3420
ggttcaagat tcaccttctg tctatctctg ggattcttca attctaattg gtacaaaaaa	3480
gaaaggaaaa gtgctgggct catagttggt cccatttgg agtggtcata tgaacaggac	3540
aagtcacat tgттаacagc cttttcata tcacagattg cacgttcgaa ttcttttct	3600
gaattcaagc atgtgtatth cattgaacta cccacagctt ctgagaagtc ttcaactaac	3660
ctggtcatca gcttagtggt gaggtctccc acatacagtt ctctatttga gccaacctgc	3720
tccttataac ttagtccaaa tttcaagttc cctgtatttg agctgatgct tgtgaactct	3780
gtaggagagt cgtctgaata gaaacataaa ttccgtaggg ctgcatttgt aaaataactt	3840
ttgtctagct tatcagcaat ggcttcagaa ttgctttccc tggtaactaag ccgaacctca	3900
tcctttagtc tcagaacttc actgaaaaag cccaatctag atctacttct atgtcataa	3960
ctaccaat tctgatcata atgtccttga attaaaagat acttgaagca ttcaaagaat	4020
tcacttctt ggtaggctat tgttgcataa ttttttaata acaaaccctaa agggcagatg	4080
tcctcgggtg cttcaagaaa ataagtcaat ttaaattggag atagataaac agcatcat	4140
aactctttat acacatcaga cctgagcaca tctggatcaa aatccttcac ctcatgcatt	4200

ES 2 922 981 T3

gacacctctg ctttaatctc tctcaacact ccaaaagggg cccacaatga ctcaagagac	4260
tctcgcctcat caacagatgg attttttgat ttcaacttgg tgatctcaac ttttgcctcc	4320
tcactattag ccatcttggc tagtgtcatt tgtacgtcat ttctaatacc ctcaaaggcc	4380
cttacttgat cctctgttaa actctcatac atcactgata attcttcttg attggttctg	4440
gttcttgaac cggtgctcac aagacctggt agatttttta atattaagta gtccatggaa	4500
tcaggatcaa gattatacct gccttttggt 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 agaatctgtc caatcctctt atcatggtgt cctcttgttc cagtgttaga	4860
ctcccactta gagggggggt tacaacaaca caatcaaact tgactttggg ctcaataaac	4920
ttctcaaac actttatttg atctgtcagg cgatcaggtg tctctttggt taccaagtga	4980
cacagataac taacatttaa tagatattta aaccttcttg caaagtaaag atctgcatct	5040
tccccttcac ccaaaattgt ctggaagagt tccacagcca tcctctgaat cagcacctct	5100
gatccagaca tgcagtcgac ccttaacttt gacatcaaat ccacatgatg gatttgattt	5160
gcatatgcca tcaagaaata tcttagacct tgtaaaaatg tctggttcct tttggaagg	5220
gaacagagta cagctaacac taacaatctt aatattggcc ttgtcattgt catgagttog	5280
tggctaaaaat ccaaccagct ggtcatttcc tcacacattt caattaacac atcctccgaa	5340
aatataggca ggaaaaatct ctttgatca cagtaaaaag agccttgttc ttccaatacc	5400
ccattgatgg atagatagat agaatagcac cttgacttct cacctgtttt ttggtaaaac	5460
aagagaccaa atgtattctt tgtcagatga aatctttgta cataacactc tcttagtcta	5520
acattcccaa aatatctaga atactctctt tcattgatta acaatcgga ggaaaatgat	5580
gtcttcatcg agttgaccaa tgcaagggaa atggaggaca aaatcctaaa taatttcttc	5640
tgctcacctt cactaagct gctgaatggc tgatgtctac agattttctc aaattccttg	5700
ttaatagtat atctcatcac tggctgtca gaaacaagtg cctgagctaa aatcatcaag	5760
ctatccatat caggggtgtt tattagtttt tccagctgtg accagagatc ttgatgagag	5820
ttcttcaatg ttctggaaca cgctgaacc cacttggggc tggatcaaa tttcttctt	5880
attagtttaa tcgctccag aatatctaga agtctgtcat tgactaacat taacatttgt	5940
ccaacaacta ttcccgcat tcttaacctt acaattgcat catcatgcgt tttgaaaaga	6000
tcacaaaagta aattgagtaa aactaagtcc agaaacagta aagtgtttct cctggtgttg	6060

ES 2 922 981 T3

aaaactttta gacctttcac tttgttacac acggaaggg cttgaagata acacctctct 6120
 acagcatcaa tagatataga attctcatct gactggcttt ccatgttgac ttcacttatt 6180
 ggatgcaatg cgatagagta gactacatcc atcaacttgt ttgcacaaaa agggcagctg 6240
 ggcacatcac tgtctttgtg gcttcctaata agatcaagt catttataag cttagacttt 6300
 tgtgaaaatt tgaatttccc caactgcttg tcaaaaatct ccttcttaa ccaaacctt 6360
 aactttatga gttcttctct tatgacagat tctctaattgt ctctctaac cccaacaag 6420
 agggattcat ttaacctctc atcataacc aaagaattct ttttcaagca ttcgatgttt 6480
 tctaatcca agctctggtt ttttgtgtg gacaaactat ggatcaatcg ctggtattct 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 aacaaaggtt 6780
 tccaatagga tgagtgtttt ccctgtgagt ttgaagccat ccggaatgac ttttgggaagg 6840
 gtgggacata gtatgccata gtcagacagg 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
 tccatgtca agtgccgcct aggatcctcg gtgcg 7115

<210> 11
 <211> 3411
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Segmento S del virus Junín Candid nº1

10

<400> 11
 gcgcaccggg gatcctaggc gattttggtt acgctataat tgtaactgtt ttctgtttg 60
 acaacatcaa aaacatccat tgcacaatgg ggcagttcat tagcttcatg caagaaatac 120
 caaccttttt gcaggaggct ctgaacattg ctcttgttgc agtcagtctc attgccatca 180
 ttaagggat agtgaacttg taaaaagtg gtttattcca attctttgta ttcctagcgc 240
 ttgcaggaag atcctgcaca gaagaagctt tcaaaatcgg actgcacact gagttccaga 300
 ctgtgtcctt ctcaatggtg ggtctctttt ccaacaatcc acatgaccta cctttgttgt 360
 gtaccttaaa caagagccat ctttacatta aggggggcaa tgcttcattt cagatcagct 420
 ttgatgatat tgcagtattg ttgccacagt atgatgttat aatacaacat ccagcagata 480
 tgagctggtg ttccaaaagt gatgatcaaa tttggttgtc tcagtggttc atgaatgctg 540

ES 2 922 981 T3

tgggacatga ttggcatcta gaccacccat ttctgtgtag gaaccgtgca aagacagaag	600
gcttcatctt tcaagtcaac acctccaaga ctgggtgtaa tggaaattat gctaagaagt	660
ttaagactgg catgcatcat ttatatagag aatatcctga cccttgcttg aatggcaaac	720
tgtgcttaat gaaggcacia cctaccagtt ggcctctcca atgtccactc gaccacgtta	780
acacattaca cttccttaca agaggtaaaa acattcaact tccaaggagg tccttgaaag	840
cattcttctc ctggctcttg acagactcat cgggcaagga taccctgga ggctattgtc	900
tagaagagtg gatgctcgtg gcagccaaaa tgaagtgttt tggcaatact gctgtagcaa	960
aatgcaattt gaatcatgac tctgaattct gtgacatgtt gaggtcttt gattacaaca	1020
aaaatgctat caaaacccta aatgatgaaa ctaagaaaca agtaaactctg atggggcaga	1080
caatcaatgc cctgatatct gacaatttat tgatgaaaaa caaaattagg gaactgatga	1140
gtgtccctta ctgcaattac acaaaatfff ggtatgtcaa ccacacactt tcaggacaac	1200
actcattacc aaggtgctgg ttaataaaaa acaacagcta tttgaacatc tctgacttcc	1260
gtaatgactg gatattagaa agtgacttct taatttctga aatgctaagc aaagagtatt	1320
cggacaggca gggtaaaaact cctttgactt tagttgacat ctgtatttgg agcacagtat	1380
tcttcacagc gtcactcttc cttcacttgg tgggtatacc ctcccacaga cacatcaggg	1440
gcgaagcatg ccctttgcca cacaggttga acagcttggg tggttgcaga tgtggttaagt	1500
accccaatct aaagaaacca acagtttggc gtagaggaca ctaagacctc ctgagggtcc	1560
ccaccagccc gggcactgcc cgggctgggt tggccccca gtccgoggcc tggccgcgga	1620
ctggggaggc actgcttaca gtgcataggc tgcttcggg aggaacagca agctcgggtg	1680
taatagaggt gtaggttcct cctcatagag cttcccatct agcactgact gaaacattat	1740
gcagtctagc agagcacagt gtggttcact ggaggccaac ttgaaggag tatccttttc	1800
cctctttttc ttattgaaa ccactccatt gtgatatttg cataagtgac catatttctc	1860
ccagacctgt tgatcaaact gcctggcttg ttcagatgtg agcttaacat caaccagttt	1920
aagatctctt cttccatgga ggtcaaaaa cttcctgatg tcatcggatc cttgagtagt	1980
cacaaccatg tctggaggca gcaagccgat cacgtaacta agaactcctg gcattgcatc	2040
ttctatgtcc ttcattaaga tgccgtgaga gtgtctgcta ccatttttaa accctttctc	2100
atcatgtggt tttctgaagc agtgaatgta ctgcttacct gcaggttga ataatgcat	2160
ctcaacaggg tcagtggctg gtccttcaat gtcgagccaa aggtgttgg tggggtcgag	2220
tttccccact gcctctctga tgacagcttc ttgtatctct gtcaagttag ccaatctcaa	2280
attctgaccg tttttttccg gctgtctagg accagcaact ggtttccttg tcagatcaat	2340
acttgtgttg tcccatgacc tgctgtgat ttgtgatcta gaaccaatat aaggccaacc	2400

ES 2 922 981 T3

atcgccagaa agacaaagtt tgtacaaaag gttttcataa ggatttctat tgcctggttt 2460
ctcatcaata aacatgcctt ctcttcgttt aacctgaatg gttgatttta tgaggggaaga 2520
gaagttttct ggggtgactc tgattgttcc caacatgttt ccaccatcaa gaatagatgc 2580
tccagccttt actgcagctg aaagactgaa gttgtaacca gaaatattga tggagctttc 2640
atcttttagtc acaatctgaa ggcagtcacg ttcctgagtc agtctgtcaa ggtcacttaa 2700
gtttggatac ttcacagtgt atagaagccc aagtgagggt aaagcttgta tgacactggt 2760
cattgtctca cctccttgaa cagtcacgca tgcaattgtc aatgcaggaa cagagccaaa 2820
ctgattgttt agctttgaag ggtctttaac atcccatatc ctcaccacac catttcccc 2880
agtcccttgc tgttgaaatc ccagtggtct caatatctct gatcttttag caagttgtga 2940
ctgggacaag ttacccatgt aaaccccctg agagcctgtc tctgctcttc ttatcttgtt 3000
ttttaatttc tcaaggctcag acgccaaact catcagttca tccctcccca gatctcccac 3060
cttgaaaact gtgtttcggt gaacactcct catggacatg agtctgtcaa cctctttatt 3120
caggctcctc aacttggtga ggtcttcttc ccccttttta gtctttctga gtgcccgctg 3180
cacctgtgcc acttggttga agtcgatgct gtcagcaatt agcttggcgt ccttcaaaac 3240
atctgacttg acagtctgag tgaattggct caaacctctc ctttaaggact gagtccatct 3300
aaagcttgga acctccttgg agtgtgccat gccagaagtt ctggtgattt tgatctagaa 3360
tagagttgct cagtgaaagt gttagacact atgcctagga tccactgtgc g 3411

<210> 12

<211> 558

5 <212> PRT

<213> Virus de la coriomeningitis linfocítica

<220>

10 <223> Proteína NP de la cepa Clon 13 del LCMV
(N.º de acceso de GenBank ABC96002.1; GI:86440166)

<400> 12

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 Ser Phe Thr Ser Asp Val Lys Ala Ala Val Ile
20 25 30

Lys Asp Ala Thr Asn 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 His Ser Leu Val Asp Leu

ES 2 922 981 T3

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 Gln Ala Ser Gly Val Tyr Met Gly Asn	115	120	125
Leu Thr Thr Gln Gln Leu Asp Gln Arg Ser Gln Ile Leu Gln Ile Val	130	135	140
Gly Met Arg Lys Pro Gln Gln Gly Ala Ser Gly Val Val Arg Val Trp	145	150	155
Asp Val Lys Asp Ser Ser Leu Leu Asn Asn Gln Phe Gly Thr Met Pro	165	170	175
Ser Leu Thr Met Ala Cys Met Ala Lys Gln Ser Gln Thr Pro 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 Asn 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
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 Arg Lys Leu Asn Met Phe	275	280	285
Val Ser Asp Gln Val Gly Asp Arg Asn Pro Tyr Glu Asn Ile Leu Tyr	290	295	300
Lys Val Cys Leu Ser Gly Glu Gly Trp Pro Tyr Ile Ala Cys Arg Thr	305	310	315
			320

ES 2 922 981 T3

Ser Ile Val Gly Arg Ala Trp Glu Asn Thr Thr Ile Asp Leu Thr Ser
 325 330 335

Glu Lys Pro Ala Val Asn Ser Pro Arg Pro Ala Pro Gly Ala Ala Gly
 340 345 350

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

Leu Met Gly Gly Ile Asp Pro Asn Ala Pro Thr Trp Ile Asp Ile Glu
 370 375 380

Gly Arg Phe Asn Asp Pro Val Glu Ile Ala Ile Phe Gln Pro Gln Asn
 385 390 395 400

Gly Gln Phe Ile His Phe Tyr Arg Glu Pro Val Asp Gln Lys Gln Phe
 405 410 415

Lys Gln Asp Ser Lys Tyr Ser His Gly Met Asp Leu Ala Asp Leu Phe
 420 425 430

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

Gly Met Val Leu Ser Cys Gln Gly Ser Asp Asp Ile Arg Lys Leu Leu
 450 455 460

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

Arg Glu Ala Ser Arg Glu Tyr Glu Asp Lys Val Trp Asp Lys Tyr Gly
 485 490 495

Trp Leu Cys Lys Met His Thr Gly Ile Val Arg Asp Lys Lys Lys Lys
 500 505 510

Glu Ile Thr Pro His Cys Ala Leu Met Asp Cys Ile Ile Phe Glu Ser
 515 520 525

Ala Ser Lys Ala Arg Leu Pro Asp Leu Lys Thr Val His Asn Ile Leu
 530 535 540

Pro His Asp Leu Ile Phe Arg Gly Pro Asn Val Val Thr Leu
 545 550 555

- <210> 13
- <211> 498
- 5 <212> PRT
- <213> Virus de la coriomeningitis linfocítica

- <220>
- <223> Proteína GP de la cepa Clon 13 del LCMV
 10 (N.º de acceso de GenBank ABC96001.2; GI: 116563462)

<400> 13

ES 2 922 981 T3

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 Val Ile Thr Gly Ile
 20 25 30

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

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

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

Met Ser His 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 Ser His Asn Phe Cys Asn Leu Thr Ser Ala
 115 120 125

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

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

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

Ala Gln Ser Ala Gln Ser Gln Cys Arg 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 Ser
 210 215 220

ES 2 922 981 T3

Tyr Gln Tyr Leu Ile Ile Gln Asn Arg Thr Trp Glu Asn His Cys Thr
 225 230 235 240
 Tyr Ala Gly Pro Phe Gly Met Ser Arg Ile Leu Leu Ser Gln Glu Lys
 245 250 255
 Thr Lys 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
 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 Thr 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
 Val Ser Ile Phe Leu His Leu Val Lys Ile Pro Thr His Arg His Ile
 450 455 460
 Lys Gly Gly Ser Cys Pro Lys Pro His Arg Leu Thr Asn Lys Gly Ile
 465 470 475 480
 Cys Ser Cys Gly Ala Phe Lys Val Pro Gly Val Lys Thr Val Trp Lys
 485 490 495

Arg Arg

- 5 <210> 14
- <211> 2210
- <212> PRT
- <213> Virus de la coriomeningitis linfocítica

ES 2 922 981 T3

<220>

<223> Proteína L de la cepa Clon 13 del LCMV
(N.º de acceso de GenBank ABC96004.1; GI: 86440169)

5

<400> 14

```

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

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

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 Thr His Asn His
 50          55          60

Asp Asp Lys Ser Val Glu Thr Ile Leu Val 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 Arg Glu
 115         120         125

Asp Leu Ala Val Ala Gly Val Thr Leu Val Pro Ile Val Asp Gly Arg
 130         135         140

Cys Asp Tyr Asp Asn Ser Phe Met Pro Glu Trp Ala Asn Phe Lys Phe
 145         150         155         160

Arg Asp Leu Leu Phe Lys Leu Leu Glu Tyr Ser Asn Gln Asn Glu Lys
 165         170         175
    
```

ES 2 922 981 T3

Val Phe Glu Glu Ser Glu Tyr Phe Arg Leu Cys Glu Ser Leu Lys Thr
 180 185 190

Thr Ile Asp Lys Arg Ser Gly Met Asp Ser Met Lys Ile Leu Lys Asp
 195 200 205

Ala Arg Ser Thr His Asn Asp Glu Ile Met Arg Met Cys His Glu Gly
 210 215 220

Ile Asn Pro Asn Met Ser Cys Asp Asp Val Val Phe Gly Ile Asn Ser
 225 230 235 240

Leu Phe Ser Arg Phe Arg Arg Asp Leu Glu Ser Gly Lys Leu Lys Arg
 245 250 255

Asn Phe Gln Lys Val Asn Pro Glu Gly Leu Ile Lys Glu Phe Ser Glu
 260 265 270

Leu Tyr Glu Asn Leu Ala Asp Ser Asp Asp Ile Leu Thr Leu Ser Arg
 275 280 285

Glu Ala Val Glu Ser Cys Pro Leu Met Arg Phe Ile Thr Ala Glu Thr
 290 295 300

His Gly His 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 Phe Lys Gly Leu Lys Asn Asp Lys His Trp Val Gly
 355 360 365

Cys Cys Tyr Ser 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 Lys Lys Ser Lys Val
 385 390 395 400

Phe Arg Lys Val Ser Phe Glu Glu Leu Phe Arg Ala Ser Ile Ser Glu
 405 410 415

Phe Ile Ala Lys Ile Gln Lys Cys Leu Leu Val Val Gly Leu Ser Phe

ES 2 922 981 T3

420	425	430																									
Glu	His	Tyr	Gly	Leu	Ser	Glu	His	Leu	Glu	Gln	Glu	Cys	His	Ile	Pro												
		435					440					445															
Phe	Thr	Glu	Phe	Glu	Asn	Phe	Met	Lys	Ile	Gly	Ala	His	Pro	Ile	Met												
	450					455					460																
Tyr	Tyr	Thr	Lys	Phe	Glu	Asp	Tyr	Asn	Phe	Gln	Pro	Ser	Thr	Glu	Gln												
465					470					475					480												
Leu	Lys	Asn	Ile	Gln	Ser	Leu	Arg	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	Ile	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												
	530					535					540																
Lys	Thr	Gly	Glu	Ser	Ser	Arg	Cys	Tyr	Ser	Ile	Gln	Gly	Pro	Asp	Gly												
545					550					555					560												
His	Leu	Ile	Ser	Phe	Tyr	Ala	Asp	Pro	Lys	Arg	Phe	Phe	Leu	Pro	Ile												
				565					570					575													
Phe	Ser	Asp	Glu	Val	Leu	Tyr	Asn	Met	Ile	Asp	Ile	Met	Ile	Ser	Trp												
			580					585					590														
Ile	Arg	Ser	Cys	Pro	Asp	Leu	Lys	Asp	Cys	Leu	Thr	Asp	Ile	Glu	Val												
		595					600					605															
Ala	Leu	Arg	Thr	Leu	Leu	Leu	Leu	Met	Leu	Thr	Asn	Pro	Thr	Lys	Arg												
	610					615					620																
Asn	Gln	Lys	Gln	Val	Gln	Ser	Val	Arg	Tyr	Leu	Val	Met	Ala	Ile	Val												
625					630					635					640												
Ser	Asp	Phe	Ser	Ser	Thr	Ser	Leu	Met	Asp	Lys	Leu	Arg	Glu	Asp	Leu												
				645					650					655													
Ile	Thr	Pro	Ala	Glu	Lys	Val	Val	Tyr	Lys	Leu	Leu	Arg	Phe	Leu	Ile												
			660					665					670														

ES 2 922 981 T3

Lys Thr Ile Phe Gly Thr Gly Glu Lys Val Leu Leu Ser Ala Lys Phe
 675 680 685
 Lys Phe Met Leu Asn Val Ser Tyr Leu Cys His Leu Ile Thr Lys Glu
 690 695 700
 Thr Pro Asp Arg Leu Thr Asp Gln Ile Lys Cys Phe Glu Lys Phe Phe
 705 710 715 720
 Glu Pro Lys Ser Gln Phe Gly Phe Phe Val Asn Pro Lys Glu Ala Ile
 725 730 735
 Thr Pro Glu Glu Glu Cys Val Phe Tyr Glu Gln Met Lys Arg Phe Thr
 740 745 750
 Ser Lys Glu Ile Asp Cys Gln His Thr Thr Pro Gly Val Asn Leu Glu
 755 760 765
 Ala Phe Ser Leu Met Val Ser Ser Phe Asn Asn Gly Thr Leu Ile Phe
 770 775 780
 Lys Gly Glu Lys Lys Leu Asn Ser Leu Asp Pro Met Thr Asn Ser Gly
 785 790 795 800
 Cys Ala Thr Ala Leu Asp Leu Ala Ser Asn Lys Ser Val Val Val Asn
 805 810 815
 Lys His Leu Asn Gly Glu Arg Leu Leu Glu Tyr Asp Phe Asn Lys Leu
 820 825 830
 Leu Val Ser Ala Val Ser Gln Ile Thr Glu Ser Phe Val Arg Lys Gln
 835 840 845
 Lys Tyr Lys Leu Ser His Ser Asp Tyr Glu Tyr Lys Val Ser Lys Leu
 850 855 860
 Val Ser Arg Leu Val Ile Gly Ser Lys Gly Glu Glu Thr Gly Arg Ser
 865 870 875 880
 Glu Asp Asn Leu Ala Glu Ile Cys Phe Asp Gly Glu Glu Glu Thr Ser
 885 890 895
 Phe Phe Lys Ser Leu Glu Glu Lys Val Asn Thr Thr Ile Ala Arg Tyr
 900 905 910
 Arg Arg Gly Arg Arg Ala Asn Asp Lys Gly Asp Gly Glu Lys Leu Thr
 915 920 925

ES 2 922 981 T3

Asn Thr Lys Gly Leu His His Leu Gln Leu Ile Leu Thr Gly Lys Met
 930 935 940

Ala His Leu Arg Lys Val Ile Leu Ser Glu Ile Ser Phe His Leu Val
 945 950 955 960

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

Cys Glu Ala Val Glu Gly Ser Thr Glu Leu Ser Pro Leu Tyr Phe Thr
 980 985 990

Ser Val Ile Lys Asp Gln Cys Gly Leu Asp Glu Met Ala Lys Asn Leu
 995 1000 1005

Cys Arg Lys Phe Phe Ser Glu Asn Asp Trp Phe Ser Cys Met Lys
 1010 1015 1020

Met Ile Leu Leu Gln Met Asn Ala Asn Ala Tyr Ser Gly Lys Tyr
 1025 1030 1035

Arg His Met Gln Arg Gln Gly Leu Asn Phe Lys Phe Asp Trp Asp
 1040 1045 1050

Lys Leu Glu Glu Asp Val Arg Ile Ser Glu Arg Glu Ser Asn Ser
 1055 1060 1065

Glu Ser Leu Ser Lys Ala Leu Ser Leu Thr Gln Cys Met Ser Ala
 1070 1075 1080

Ala Leu Lys Asn Leu Cys Phe Tyr Ser Glu Glu Ser Pro Thr Ser
 1085 1090 1095

Tyr Thr Ser Val Gly Pro Asp Ser Gly Arg Leu Lys Phe Ala Leu
 1100 1105 1110

Ser Tyr Lys Glu Gln Val Gly Gly Asn Arg Glu Leu Tyr Ile Gly
 1115 1120 1125

Asp Leu Arg Thr Lys Met Phe Thr Arg Leu Ile Glu Asp Tyr Phe
 1130 1135 1140

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

Lys Glu Phe Glu Asn Ala Ile Leu Ser Met Thr Ile Asn Val Arg
 1160 1165 1170

ES 2 922 981 T3

Glu Gly Phe Leu Asn Tyr Ser Met Asp His Ser Lys Trp Gly Pro
 1175 1180 1185
 Met Met Cys Pro Phe Leu Phe Leu Met Phe Leu Gln Asn Leu Lys
 1190 1195 1200
 Leu Gly Asp Asp Gln Tyr Val Arg Ser Gly Lys Asp His Val Ser
 1205 1210 1215
 Thr Leu Leu Thr Trp His Met His Lys Leu Val Glu Val Pro Phe
 1220 1225 1230
 Pro Val Val Asn Ala Met Met Lys Ser Tyr Val Lys Ser Lys Leu
 1235 1240 1245
 Lys Leu Leu Arg Gly Ser Glu Thr Thr Val Thr Glu Arg Ile Phe
 1250 1255 1260
 Arg Gln Tyr Phe Glu Met Gly Ile Val Pro Ser His Ile Ser Ser
 1265 1270 1275
 Leu Ile Asp Met Gly Gln Gly Ile Leu His Asn Ala Ser Asp Phe
 1280 1285 1290
 Tyr Gly Leu Leu Ser Glu Arg Phe Ile Asn Tyr Cys Ile Gly Val
 1295 1300 1305
 Ile Phe Gly Glu Arg Pro Glu Ala Tyr Thr Ser Ser Asp Asp Gln
 1310 1315 1320
 Ile Thr Leu Phe Asp Arg Arg Leu Ser Asp Leu Val Val Ser Asp
 1325 1330 1335
 Pro Glu Glu Val Leu Val Leu Leu Glu Phe Gln Ser His Leu Ser
 1340 1345 1350
 Gly Leu Leu Asn Lys Phe Ile Ser Pro Lys Ser Val Ala Gly Arg
 1355 1360 1365
 Phe Ala Ala Glu Phe Lys Ser Arg Phe Tyr Val Trp Gly Glu Glu
 1370 1375 1380
 Val Pro Leu Leu Thr Lys Phe Val Ser Ala Ala Leu His Asn Val
 1385 1390 1395
 Lys Cys Lys Glu Pro His Gln Leu Cys Glu Thr Ile Asp Thr Ile

ES 2 922 981 T3

1400		1405		1410
Ala Asp 1415	Gln Ala Ile Ala	Asn 1420	Gly Val Pro Val	Ser Leu Val Asn 1425
Ser Ile 1430	Gln Arg Arg Thr	Leu 1435	Asp Leu Leu Lys Tyr	Ala Asn Phe 1440
Pro Leu 1445	Asp Pro Phe Leu	Leu 1450	Asn Thr Asn Thr	Asp Val Lys Asp 1455
Trp Leu 1460	Asp Gly Ser Arg	Gly 1465	Tyr Arg Ile Gln Arg	Leu Ile Glu 1470
Glu Leu 1475	Cys Pro Asn Glu	Thr 1480	Lys Val Val Arg	Lys Leu Val Arg 1485
Lys Leu 1490	His His Lys Leu	Lys 1495	Asn Gly Glu Phe	Asn Glu Glu Phe 1500
Phe Leu 1505	Asp Leu Phe Asn	Arg 1510	Asp Lys Lys Glu	Ala Ile Leu Gln 1515
Leu Gly 1520	Asp Leu Leu Gly	Leu 1525	Glu Glu Asp Leu	Asn Gln Leu Ala 1530
Asp Val 1535	Asn Trp Leu Asn	Leu 1540	Asn Glu Met Phe	Pro Leu Arg Met 1545
Val Leu 1550	Arg Gln Lys Val	Val 1555	Tyr Pro Ser Val	Met Thr Phe Gln 1560
Glu Glu 1565	Arg Ile Pro Ser	Leu 1570	Ile Lys Thr Leu	Gln Asn Lys Leu 1575
Cys Ser 1580	Lys Phe Thr Arg	Gly 1585	Ala Gln Lys Leu	Leu Ser Glu Ala 1590
Ile Asn 1595	Lys Ser Ala Phe	Gln 1600	Ser Cys Ile Ser	Ser Gly Phe Ile 1605
Gly Leu 1610	Cys Lys Thr Leu	Gly 1615	Ser Arg Cys Val	Arg Asn Lys Asn 1620
Arg Glu 1625	Asn Leu Tyr Ile	Lys 1630	Lys Leu Leu Glu	Asp Leu Thr Thr 1635

ES 2 922 981 T3

Asp Asp His Val Thr Arg Val Cys Asn Arg Asp Gly Ile Thr Leu
 1640 1645 1650
 Tyr Ile Cys Asp Lys Gln Ser His Pro Glu Ala His Arg Asp His
 1655 1660 1665
 Ile Cys Leu Leu Arg Pro Leu Leu Trp Asp Tyr Ile Cys Ile Ser
 1670 1675 1680
 Leu Ser Asn Ser Phe Glu Leu Gly Val Trp Val Leu Ala Glu Pro
 1685 1690 1695
 Thr Lys Gly Lys Asn Asn Ser Glu Asn Leu Thr Leu Lys His Leu
 1700 1705 1710
 Asn Pro Cys Asp Tyr Val Ala Arg Lys Pro Glu Ser Ser Arg Leu
 1715 1720 1725
 Leu Glu Asp Lys Val Asn Leu Asn Gln Val Ile Gln Ser Val Arg
 1730 1735 1740
 Arg Leu Tyr Pro Lys Ile Phe Glu Asp Gln Leu Leu Pro Phe Met
 1745 1750 1755
 Ser Asp Met Ser Ser Lys Asn Met Arg Trp Ser Pro Arg Ile Lys
 1760 1765 1770
 Phe Leu Asp Leu Cys Val Leu Ile Asp Ile Asn Ser Glu Ser Leu
 1775 1780 1785
 Ser Leu Ile Ser His Val Val Lys Trp Lys Arg Asp Glu His Tyr
 1790 1795 1800
 Thr Val Leu Phe Ser Asp Leu Ala Asn Ser His Gln Arg Ser Asp
 1805 1810 1815
 Ser Ser Leu Val Asp Glu Phe Val Val Ser Thr Arg Asp Val Cys
 1820 1825 1830
 Lys Asn Phe Leu Lys Gln Val Tyr Phe Glu Ser Phe Val Arg Glu
 1835 1840 1845
 Phe Val Ala Thr Thr Arg Thr Leu Gly Asn Phe Ser Trp Phe Pro
 1850 1855 1860
 His Lys Glu Met Met Pro Ser Glu Asp Gly Ala Glu Ala Leu Gly
 1865 1870 1875

ES 2 922 981 T3

Pro Phe Gln Ser Phe Val Ser Lys Val Val Asn Lys Asn Val Glu
 1880 1885 1890

Arg Pro Met Phe Arg Asn Asp Leu Gln Phe Gly Phe Gly Trp Phe
 1895 1900 1905

Ser Tyr Arg Met Gly Asp Val Val Cys Asn Ala Ala Met Leu Ile
 1910 1915 1920

Arg Gln Gly Leu Thr Asn Pro Lys Ala Phe Lys Ser Leu Lys Asp
 1925 1930 1935

Leu Trp Asp Tyr Met Leu Asn Tyr Thr Lys Gly Val Leu Glu Phe
 1940 1945 1950

Ser Ile Ser Val Asp Phe Thr His Asn Gln Asn Asn Thr Asp Cys
 1955 1960 1965

Leu Arg Lys Phe Ser Leu Ile Phe Leu Val Arg Cys Gln Leu Gln
 1970 1975 1980

Asn Pro Gly Val Ala Glu Leu Leu Ser Cys Ser His Leu Phe Lys
 1985 1990 1995

Gly Glu Ile Asp Arg Arg Met Leu Asp Glu Cys Leu His Leu Leu
 2000 2005 2010

Arg Thr Asp Ser Val Phe Lys Val Asn Asp Gly Val Phe Asp Ile
 2015 2020 2025

Arg Ser Glu Glu Phe Glu Asp Tyr Met Glu Asp Pro Leu Ile Leu
 2030 2035 2040

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

Asp Gly Ile Arg Ser Ile Asp Phe Glu Arg Val Gly Pro Glu Trp
 2060 2065 2070

Glu Pro Val Pro Leu Thr Val Lys Met Gly Ala Leu Phe Glu Gly
 2075 2080 2085

Arg Asn Leu Val Gln Asn Ile Ile Val Lys Leu Glu Thr Lys Asp
 2090 2095 2100

Met Lys Val Phe Leu Ala Gly Leu Glu Gly Tyr Glu Lys Ile Ser
 2105 2110 2115

ES 2 922 981 T3

Asp Val Leu Gly Asn Leu Phe Leu His Arg Phe Arg Thr Gly Glu
2120 2125 2130

His Leu Leu Gly Ser Glu Ile Ser Val Ile Leu Gln Glu Leu Cys
2135 2140 2145

Ile Asp Arg Ser Ile Leu Leu Ile Pro Leu Ser Leu Leu Pro Asp
2150 2155 2160

Trp Phe Ala Phe Lys Asp Cys Arg Leu Cys Phe Ser Lys Ser Arg
2165 2170 2175

Ser Thr Leu Met Tyr Glu Thr Val Gly Gly Arg Phe Arg Leu Lys
2180 2185 2190

Gly Arg Ser Cys Asp Asp Trp Leu Gly Gly Ser Val Ala Glu Asp
2195 2200 2205

Ile Asp
2210

<210> 15

<211> 90

5 <212> PRT

<213> Virus de la coriomeningitis linfocítica

<220>

10 <223> Proteína Z de la cepa Clon 13 del LCMV
(N.º de acceso de GenBank ABC96003.1; GI:86440168)

<400> 15

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

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

Lys Ser Cys Trp Gln Lys 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 Tyr Pro Leu Pro Thr Arg Leu Lys Ile Ser Thr
65 70 75 80

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

15 <210> 16

<211> 498

<212> PRT

<213> Virus de la coriomeningitis linfocítica

20 <220>

<223> Proteína GP de la cepa WE del LCMV

<400> 16

ES 2 922 981 T3

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 Val Ser
 35 40 45

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gln Ser Ala Ile Ser Gln Cys Arg 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

ES 2 922 981 T3

Gly Trp Ala Gly Ser Asp Gly Lys Thr Thr Trp Cys Ser Gln Thr Ser
 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 Lys 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 Gln Asp Val
 325 330 335

Glu Ser Ala Leu His Val 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 Thr 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 Lys Ile Pro Thr His Arg His Ile
 450 455 460
 Lys Gly Gly Ser Cys Pro Lys Pro His Arg Leu Thr Asn Lys Gly Ile
 465 470 475 480

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

Arg Arg

<210> 17

5 <211> 35

ES 2 922 981 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
5	<223> Cebador específico de WE	
	<400> 17	
	aatcgtctct aaggatgggt cagattgga caatg	35
10	<210> 18	
	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador de fusión específico de WE que lleva un saliente complementario para el cebador específico de WET	
	<400> 18	
20	aatcgtctct aaggatgggt cagattgga caatg	35
	<210> 19	
	<211> 37	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador específico de WE	
	<400> 19	
30	ctcggatgac atgttatctg ctcttggtc gattgga	37
	<210> 20	
	<211> 34	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de fusión específico de WE complementario para la secuencia de WE	
40	<400> 20	
	aatcgtctct ttcttatct cctctccag atgg	34
	<210> 21	
	<211> 23	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador específico para NP del LCMV	
50	<400> 21	
	ggctcccaga tctgaaaact gtt	23
	<210> 22	
55	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
60	<223> Cebadores específicos de NP y GP; específico de NP: igual que en la reacción de RT, específico de GP: extremo 5 prima	
	<400> 22	
65	gctggctgt cactaatggc tc	22

REIVINDICACIONES

1. Una partícula de arnavirus para usar en un método para tratar una enfermedad neoplásica en un sujeto, en donde el método comprende administrar al sujeto dicha partícula de arnavirus y un inhibidor de punto de control inmunitario, en donde dicha partícula de arnavirus es una partícula de arnavirus trisegmentada que comprende un segmento L y dos segmentos S, y en donde dicha partícula de arnavirus está genomanipulada para contener un segmento genómico de arnavirus que comprende:
- 5 (i) una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo; y
- (ii) al menos un marco de lectura abierto ("ORF") de arnavirus en una posición distinta de la posición natural de dicho ORF, en donde dicho ORF codifica la glicoproteína ("GP"), la nucleoproteína ("NP"), la proteína de matriz Z ("proteína Z") o la ARN polimerasa L dependiente de ARN ("proteína L") de dicha partícula de arnavirus.
- 10 2. Una composición farmacéutica que comprende una partícula de arnavirus, un inhibidor de punto de control inmunitario y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde dicha partícula de arnavirus es una partícula de arnavirus trisegmentada como se define en la reivindicación 1.
- 15 3. Un kit que comprende uno o más envases e instrucciones de uso, en donde dichos uno o más envases comprenden la composición farmacéutica de la reivindicación 2.
4. Un kit que comprende dos o más envases e instrucciones de uso, en donde uno de dichos envases comprende una partícula de arnavirus y otro de dichos envases comprende un inhibidor de punto de control inmunitario, en donde dicha partícula de arnavirus es una partícula de arnavirus trisegmentada como se define en la reivindicación 1.
- 20 5. Una composición farmacéutica como se define en la reivindicación 2, o un kit como se define en la reivindicación 3 o 4, para usar en un método para tratar una enfermedad neoplásica en un sujeto.
6. La partícula de arnavirus para uso de la reivindicación 1, la composición farmacéutica de la reivindicación 2, el kit de la reivindicación 3 o 4, o la composición farmacéutica para uso o el kit de uso de la reivindicación 5, en donde:
- 25 (i) dicho antígeno tumoral o antígeno asociado a tumor se selecciona del grupo que consiste en antígenos virales oncogénicos, antígenos de cáncer de testículo, antígenos oncofetales, antígenos de diferenciación tisular, antígenos proteicos mutantes, neoantígenos, adipofilina, AIM-2, ALDH1A1, BCLX (L), BING-4, CALCA, CD45, CPSF, ciclina D1, DKKI, ENAH (hMcna), Ga733 (EpCAM), EphA3, EZH2, FGF5, glipican-3, G250/MN/CAIX, HER-2/neu, IDO1, IGF2B3, IL13Ralpha2, carboxil esterasa intestinal, alfa-fetoproteína, caliceína 4, KIF20A, Lengsin, M-CSF, MCSP, mdm-2, Meloe, MMP-2, MMP-7, MUCI, MUC5AC, p53 (no mutante), PAX5, PBF, PRAME, PSMA, RAGE, RAGE-1, RGS5, RhoC, RNF43, RU2AS, secernina 1, SOX10, STEAP1 (antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de la próstata 1), survivina, telomerasa, VEGF, WT1, EGF-R, CEA, CD20, CD33, CD52, glicoproteína 100 (proteína GP100 o gp 100), MELANA/MART1, MART2, NY-ESO-1, p53, MAGE A1, MAGE A3, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, CDK4, alfa-actinina-4, ARTC1, BCR-ABL, 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, ETV6-AML, proteína de fusión ETV6-AML1, FLT3-ITD, FNI, GPNMB, proteína de fusión LDLR-fucosiltransferasaAS, NFYC, OGT, OS-9, proteína de fusión pml-RARalpha, PRDX5, PTPRK, H-ras, K-ras (oncogén viral de sarcoma de rata V-Ki-ras2 Kirsten), N-ras, RBAF600, SIRT2, SNRPDI, SSX, SSX2, proteína de fusión SYT-SSX1 o -SSX2, TGF-betaRIII, trifosfato isomerasa, ormdm-2, LMP2, HPV E6/E7, EGFRvIII (factor de crecimiento epidérmico variante III), Idiotipo, GD2, gangliósido G2), mutante Ras, p53 (mutante), proteinasa3 (PR1), tirosinasa, PSA, hTERT, puntos de corte de translocación de sarcoma, EphA2, fosfatasa ácida prostática PAP, neo-PAP, ML-IAP, AFP, ERG (gen de fusión TMPRSS2 ETS), NA17, PAX3, ALK, receptor de andrógenos, ciclina B1, ácido polisialílico, MYCN, TRP2, TRP2-Int2, GD3, fucosil GM1, mesotelina, PSCA, sLe(a), cyp1B1, PLAC1, GM3, BORIS, Tn, GLoboH, NY-BR-1, SART3, STn, anhidrasa carbónica IX, OY-TES1, proteína espermática 17, LCK, antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMWMAA), AKAP-4, SSX2, XAGE 1, B7H3, Legumina, Tie 2, Page4, VEGFR2, MAD-CT-1, FAP, PDGFR-beta, MAD-CT-2, antígeno 1 relacionado con For, TRP1, CA-125, CA19-9, calretinina, antígeno de membrana epitelial (EMA), antígeno de tumor epitelial (ETA), CD19, CD34, CD99, CD117, cromogranina, citoqueratina, desmina, proteína ácida fibrilar glial (GFAP), proteína de líquido de enfermedad quística macroscópica (GCDFP-15), antígeno HMB-45, Myo-D1, actina específica de músculo (MSA), neurofilamento, enolasa específica de neurona (NSE), fosfatasa alcalina placentaria, sinaptofisina, tiroglobulina, factor de transcripción tiroidea 1, forma dimérica de la isoenzima piruvato quinasa tipo M2 (tumor M2-PK), BAGE BAGE-1, CAGE, CTAGE, FATE, GAGE, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, HCA661, HOM-TES-85, MAGEA, MAGEB, MAGEC, NA88, NY-SAR-35, SPANXB1, SPA17, SSX, SYCP1, TPTE, carbohidrato/gangliósido GM2 (antígeno oncofetal-inmunogénico-1 OFA-I-1), GM3, CA 15-3 (CA 27.29\BCAA), CA 195, CA 242, CA 50, CAM 43, CEA, EBNA, EF2, antígeno del virus de Epstein-Barr, HLA-A2, HLA-A11, HSP70-2, KIAA0205, MUM-1, MUM-2, MUM-3, miosina clase I, GnTV, Herv-K-mel, LAGE-1, LAGE-2, (proteína espermática) SP17, SCP-1, P15(58), Hom/Mel-40, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR, TSP-180, P185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23H1, TAG-72, TAG-72-4, CA-72-4, CAM 17.1, NuMa, 13-catenina, P16, TAGE, CT7, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, 13HCG, BCA225, BTAA, CD68/KP1, CO-029, HTgp-175, M344, MG7-Ag, MOV18, NB\70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90, TAAL6, TLP, TPS, CD22, CD27, CD30, CD70, prosteina, TARP
- 55

(proteína de marco de lectura alternativo gamma del receptor de células T), Trp-p8, integrina $\alpha\beta 3$ (CD61), galactina o Ral-B, CD123, CLL-1, CD38, CS-1, CD138 y ROR1; o

(ii) dicha secuencia de nucleótidos codifica dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más antígenos tumorales o antígenos asociados a tumores o fragmentos antigénicos de los mismos.

- 5 7. La partícula de arnavirus para uso de la reivindicación 1 o 6, la composición farmacéutica de la reivindicación 2 o 6, el kit de una cualquiera de las reivindicaciones 3, 4 y 6, o la composición farmacéutica para uso o el kit para uso de la reivindicación 5 o 6, en donde dicho inhibidor de punto de control inmunitario:

10 (i) inhibe, disminuye o interfiere con la actividad de un regulador de punto de control negativo, y en donde dicho regulador de punto de control negativo se selecciona del grupo que consiste en antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), CD80, CD86, muerte celular programada 1 (PD-1), ligando de muerte celular programada 1 (PD-L1), ligando de muerte celular programada 2 (PD-L2), gen de activación de linfocitos 3 (LAG-3; también conocido como CD223), galectina-3, atenuador de linfocitos B y T (BTLA), proteína de membrana 3 de células T (TIM3), galectina-9 (GAL9), B7-H1, B7-H3, B7-H4, inmunorreceptor de células T con dominios Ig e ITIM (TIGIT/Vstm3 /WUCAM/VSIG9), supresor de Ig del dominio V de la activación de células T (VISTA), proteína relacionada con el receptor del factor de necrosis tumoral inducida por glucocorticoides (GITR), mediador de entrada del virus del herpes (HVEM), OX40, CD27, CD28, CD137, CGEN-15001T, CGEN-15022, CGEN-15027, CGEN-15049, CGEN-15052 y CGEN-15092; o

15 (ii) es un anticuerpo que se une o inhibe la actividad de muerte celular programada 1 (PD1), ligando de muerte celular programada 1 (PD-L1), antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA4), proteína de membrana 3 de células T (TIM-3), gen de activación de linfocitos 3 (LAG-3) o inmunorreceptor de células T con dominios Ig e ITIM (TIGIT).

- 20 8. La partícula de arnavirus para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 6 y 7, o la composición farmacéutica para uso o el kit para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en donde dicho sujeto padece, es susceptible o está en riesgo de padecer una enfermedad neoplásica seleccionada del grupo que consiste en leucemia linfoblástica aguda; linfoma linfoblástico agudo; leucemia linfocítica aguda; leucemia mielógena aguda; leucemia mielóide aguda (adulto/infancia); carcinoma corticosuprarrenal; cánceres relacionados con el SIDA; linfoma relacionado con el SIDA; cáncer anal; cáncer de apéndice; astrocitomas; tumor teratoideo/rabdoideo atípico; carcinoma de células basales; cáncer de las vías biliares, extrahepático (colangiocarcinoma); cáncer de vejiga; osteosarcoma óseo/histiocitoma fibroso maligno; cáncer cerebral (adulto/infantil); tumor cerebral, astrocitoma cerebeloso (adulto/infancia); tumor cerebral, astrocitoma cerebral/tumor cerebral glioma maligno; tumor cerebral, ependimoma; tumor cerebral, meduloblastoma; tumor cerebral, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales; tumor cerebral, glioma de la vía óptica e hipotalámico; glioma del tronco encefálico; cáncer de mama; adenomas/carcinoides bronquiales; tumor bronquial; linfoma de Burkitt; cáncer en la infancia; tumor gastrointestinal carcinoide; tumor carcinoide; carcinoma del adulto, sitio primario desconocido; carcinoma de origen primario desconocido; tumor embrionario del sistema nervioso central; linfoma del sistema nervioso central, primario; cáncer de cuello uterino; carcinoma corticosuprarrenal infantil; cánceres en la infancia; astrocitoma cerebral infantil; cordoma, infancia; leucemia linfocítica crónica; leucemia mielógena crónica; leucemia mielóide crónica; trastornos mieloproliferativos crónicos; cáncer de colon; cáncer colorrectal; craneofaringioma; linfoma cutáneo de células T; tumor desmoplásico de células redondas pequeñas; enfisema; cáncer endometrial; ependimoblastoma; ependimoma; cáncer de esófago; sarcoma de Ewing en la familia de tumores de Ewing; tumor extracraneal de células germinales; tumor extragonadal de células germinales; cáncer de vías biliares extrahepáticas; cáncer de vesícula biliar; cáncer gástrico (de estómago); carcinoide gástrico; tumor carcinoide gastrointestinal; tumor del estroma gastrointestinal; tumor de células germinales: tumor trofoblástico gestacional extracraneal, extragonadal u ovárico; tumor trofoblástico gestacional, sitio primario desconocido; glioma; glioma del tronco encefálico; glioma, de la vía óptica e hipotalámico infantil; leucemia de células pilosas; cáncer de cabeza y cuello; cáncer de corazón; cáncer hepatocelular (hígado); linfoma de Hodgkin; cáncer de hipofaringe; glioma hipotalámico y de la vía óptica; melanoma intraocular; carcinoma de células de los islotes (páncreas endocrino); sarcoma de Kaposi; cáncer de riñón (cáncer de células renales); histiocitosis de células de Langerhans; cáncer de laringe; cáncer de labio y cavidad oral; liposarcoma; cáncer de hígado (primario); cáncer de pulmón no microcítico; cáncer de pulmón microcítico; linfoma primario del sistema nervioso central; macroglobulinemia, Waldenström; cáncer de mama masculino; histiocitoma fibroso maligno de hueso/osteosarcoma; meduloblastoma; meduloepitelioma; melanoma; melanoma, intraocular (ojo); cáncer de células de Merkel; carcinoma de piel de células de Merkel; mesotelioma; mesotelioma, adulto maligno; cáncer de cuello escamoso metastásico con tumor primario oculto; cáncer de boca; síndrome de neoplasia endocrina múltiple; mieloma múltiple/neoplasia de células plasmáticas; micosis fungoide, síndromes mielodisplásicos; enfermedades mielodisplásicas/mieloproliferativas; leucemia mielógena, crónica; leucemia mielóide, aguda del adulto; leucemia mielóide, aguda infantil; mieloma, múltiple (cáncer de la médula ósea); trastornos mieloproliferativos crónicos; cáncer de cavidad nasal y senos paranasales; carcinoma nasofaríngeo; neuroblastoma, cáncer de pulmón no microcítico; linfoma no Hodgkin; oligodendroglioma; cáncer bucal; cáncer de cavidad oral; cáncer orofaríngeo; osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno de hueso; cáncer de ovario; cáncer epitelial de ovario (tumor del estroma epitelial superficial); tumor de células germinales de ovario; tumor de ovario de bajo potencial maligno; cáncer de páncreas; cáncer de páncreas, células de los islotes; papilomatosis; cáncer de seno paranasal y cavidad nasal; cáncer de paratiroides; cáncer de pene; cáncer de faringe; feocromocitoma; astrocitoma pineal; germinoma pineal; tumores del parénquima pineal de diferenciación intermedia; pineoblastoma y tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales; tumor hipofisario; adenoma hipofisario; 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; carcinoma del tracto respiratorio que implica el gen NUT en el cromosoma 15; retinoblastoma; rhabdomyosarcoma, infancia; cáncer de glándulas salivales; sarcoma, familia de tumores de Ewing; síndrome de Sézary; cáncer de piel (melanoma); cáncer de piel (no melanoma); cáncer de pulmón microcítico; cáncer de intestino delgado sarcoma de tejidos blandos; sarcoma de tejidos blandos; tumor de la médula espinal; carcinoma de células escamosas; cáncer de cuello escamoso con primario oculto, metastásico; cáncer de estómago (gástrico); tumor neuroectodérmico primitivo supratentorial; linfoma cutáneo de células T (micosis fungoide y síndrome de Sezary); cáncer testicular; cáncer de garganta; timoma; timoma y carcinoma tímico; cáncer de tiroides; cáncer de tiroides infantil; cáncer de células de transición de la pelvis renal y uréter; cáncer de uretra; cáncer de útero, endometrio; sarcoma uterino; cáncer de vagina; cáncer de vulva; y tumor de Wilms.

9. La partícula de arnavirus para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 6 a 8, o la composición farmacéutica para uso o el kit para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en donde dicho método comprende:

- (i) coadministrar simultáneamente dicha partícula de arnavirus y dicho inhibidor del punto de control inmunitario;
- (ii) administrar dicha partícula de arnavirus antes de la administración de dicho inhibidor de punto de control inmunitario, o administrar dicha partícula de arnavirus después de la administración de dicho inhibidor de punto de control inmunitario, opcionalmente en donde el intervalo entre la administración de dicha partícula de arnavirus y dicho inhibidor de punto de control inmunitario es de 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, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 1 semana, aproximadamente 8 días, aproximadamente 9 días, aproximadamente 10 días, aproximadamente 11 días, aproximadamente 12 días, aproximadamente 13 días, 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, aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses, aproximadamente 6 meses o más;
- (iii) administrar dicha partícula de arnavirus y dicho inhibidor de punto de control inmunitario en una cantidad terapéuticamente eficaz; o
- (iv) administrar a dicho sujeto una primera partícula de arnavirus, y administrar a dicho sujeto, después de un período de tiempo, una segunda partícula de arnavirus, en donde opcionalmente dicha primera partícula de arnavirus y dicha segunda partícula de arnavirus derivan de diferentes especies de arnavirus y/o comprenden secuencias de nucleótidos que codifican diferentes antígenos tumorales, antígenos asociados a tumores o fragmentos antigénicos de los mismos.

10. La partícula de arnavirus para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 6 a 9, la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 2, 6 y 7, el kit de una cualquiera de las reivindicaciones 3, 4, 6 y 7, o la composición farmacéutica para uso o el kit para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en donde:

- (i) la propagación de dicha partícula de arnavirus trisegmentada no da como resultado una partícula viral bisegmentada competente para la replicación;
- (ii) la propagación de dicha 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 se han infectado con 10^4 PFU de dicha partícula de arnavirus trisegmentada; o
- (iii) la recombinación intersegmentaria de los dos segmentos S, uniendo dos ORF de arnavirus en solo uno en lugar de dos segmentos separados, anula la actividad del promotor viral.

11. La partícula de arnavirus para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 6 a 10, la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 2, 6, 7 y 10, el kit de una cualquiera de las reivindicaciones 3, 4, 6, 7 y 10, o la composición farmacéutica para uso o el kit para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, 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 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.
- 5 12. La partícula de arnavirus para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 6 a 11, la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 2, 6, 7, 10 y 11, el kit de una cualquiera de las reivindicaciones 3, 4, 6, 7, 10 y 11, o la composición farmacéutica para uso o el kit para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, en donde los dos segmentos S comprenden:
- (i) una o dos secuencias de nucleótidos, cada una de las cuales codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo;
 - 10 (ii) uno o dos ORF de arnavirus duplicados; o
 - (iii) una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo y un ORF de arnavirus duplicado.
- 15 13. La partícula de arnavirus para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 6 a 12, la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 2, 6, 7 y 10 a 12, el kit de una cualquiera de las reivindicaciones 3, 4, 6, 7 y 10 a 12, o la composición farmacéutica para uso o el kit para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 12, en donde dicha partícula de arnavirus comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido, polipéptido o proteína inmunomoduladores, opcionalmente donde dicho péptido, polipéptido o proteína inmunomoduladores se selecciona del grupo que consiste en:
- (i) calreticulina (CRT), o un fragmento de la misma;
 - 20 (ii) ubiquitina o un fragmento de la misma;
 - (iii) factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), o un fragmento del mismo;
 - (iv) cadena invariable (CD74) o un fragmento antigénico de la misma;
 - (v) proteína de choque térmico 70 de Mycobacterium tuberculosis o un fragmento antigénico de la misma;
 - (vi) proteína VP22 del virus del herpes simplex 1 o un fragmento antigénico de la misma;
 - 25 (vii) ligando de CD40 o un fragmento antigénico del mismo; y
 - (viii) ligando de tirosina quinasa 3 relacionado con Fms (Flt3) o un fragmento antigénico del mismo.
- 30 14. La partícula de arnavirus para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 6 a 13, la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 2, 6, 7 y 10 a 13, el kit de una cualquiera de las reivindicaciones 3, 4, 6, 7 y 10 a 13, o la composición farmacéutica para uso o el kit para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 13, en donde dicha partícula de arnavirus deriva del virus de la coriomeningitis linfocítica ("LCMV") o virus Junín ("JUNV"), en donde opcionalmente dicho LCMV es la cepa MP, cepa WE, cepa Armstrong o cepa Armstrong Clon 13, y dicho JUNV es la cepa Candid n°1 de la vacuna JUNV, o la cepa XJ Clon 3 de la vacuna JUNV.
- 35 15. La partícula de arnavirus para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 6 a 14, la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 2, 6, 7 y 10 a 14, el kit de una cualquiera de las reivindicaciones 3, 4, 6, 7 y 10 a 14, o la composición farmacéutica para uso o el kit para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 14, en donde el crecimiento o la infectividad de dicha partícula de arnavirus no están afectados por dicha secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral, antígeno asociado a tumor o un fragmento antigénico del mismo.
- 40 16. La partícula de arnavirus para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 6 a 15, o la composición farmacéutica para uso o el kit para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 15, en donde dicha partícula de arnavirus codifica
- (i) un neoantígeno, opcionalmente en donde dicho neoantígeno es glucoquinasa dependiente de ADP (Adpgk) que tiene una mutación R203M, además opcionalmente en donde dicho sujeto padece cáncer de colon; o
 - 45 (ii) un antígeno de melanoma, opcionalmente en donde dicho antígeno de melanoma es la glicoproteína 100 (GP100), proteína relacionada con tirosinasa 1 (TRP1) o proteína relacionada con tirosinasa 2 (TRP2), además opcionalmente en donde dicho sujeto padece melanoma.

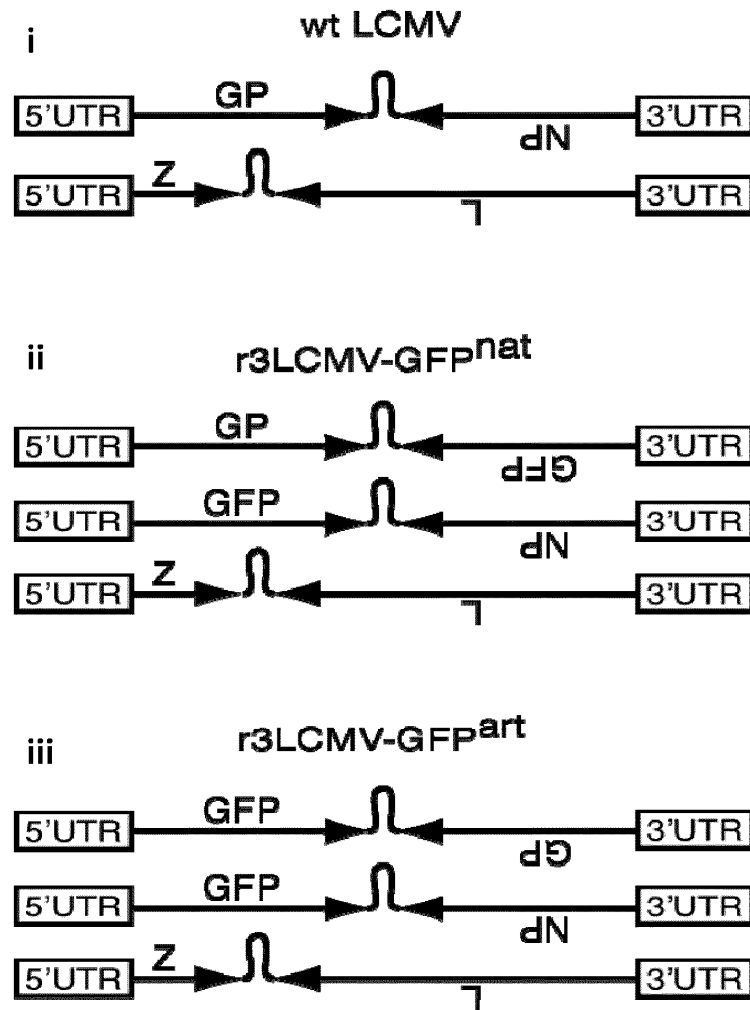


Fig. 1

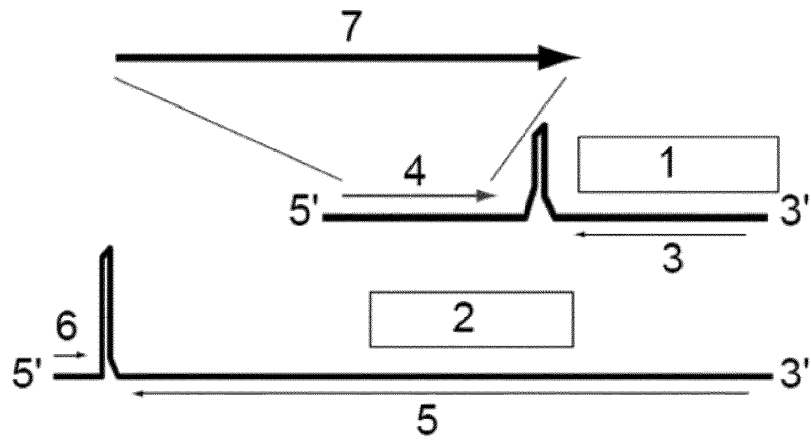


Fig. 2

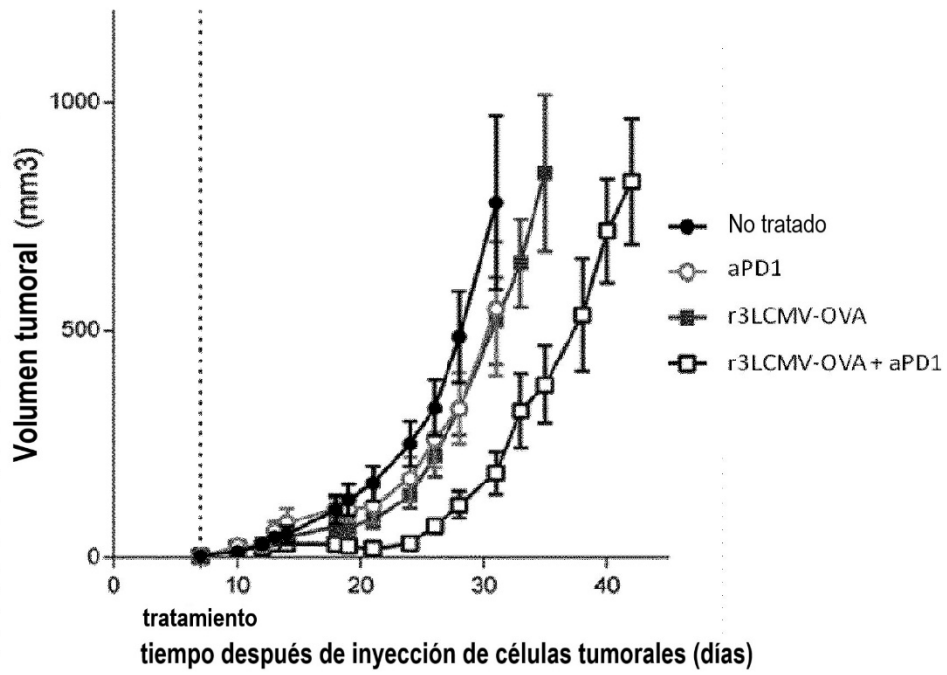


Fig. 3A

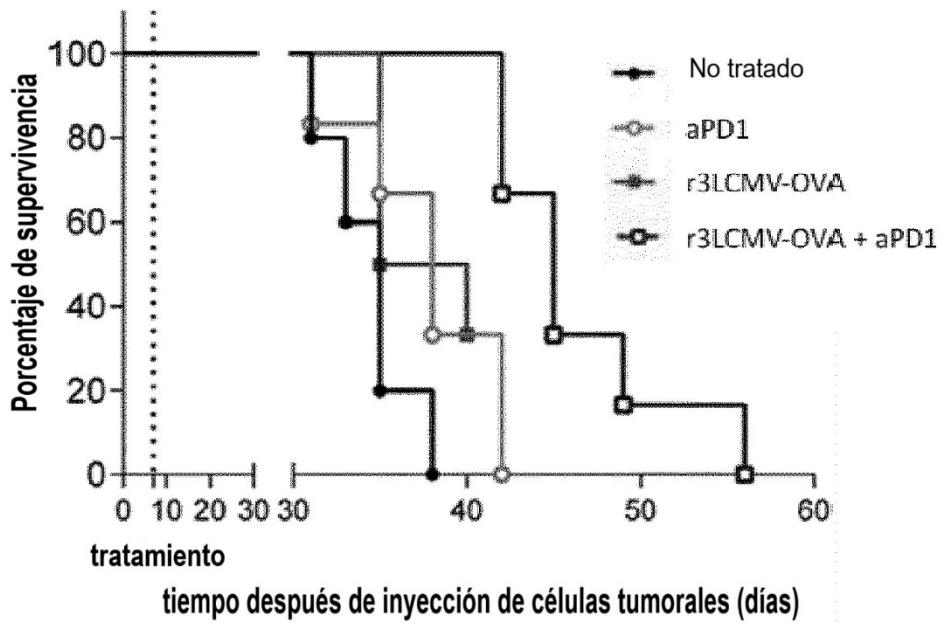
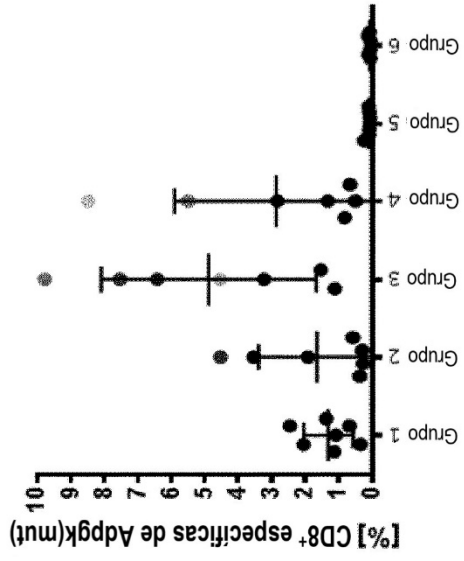
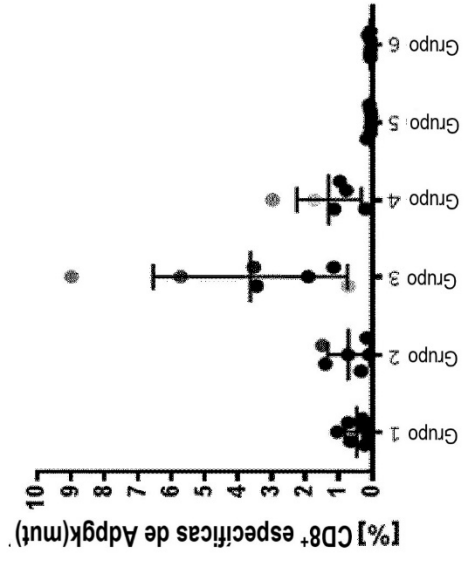
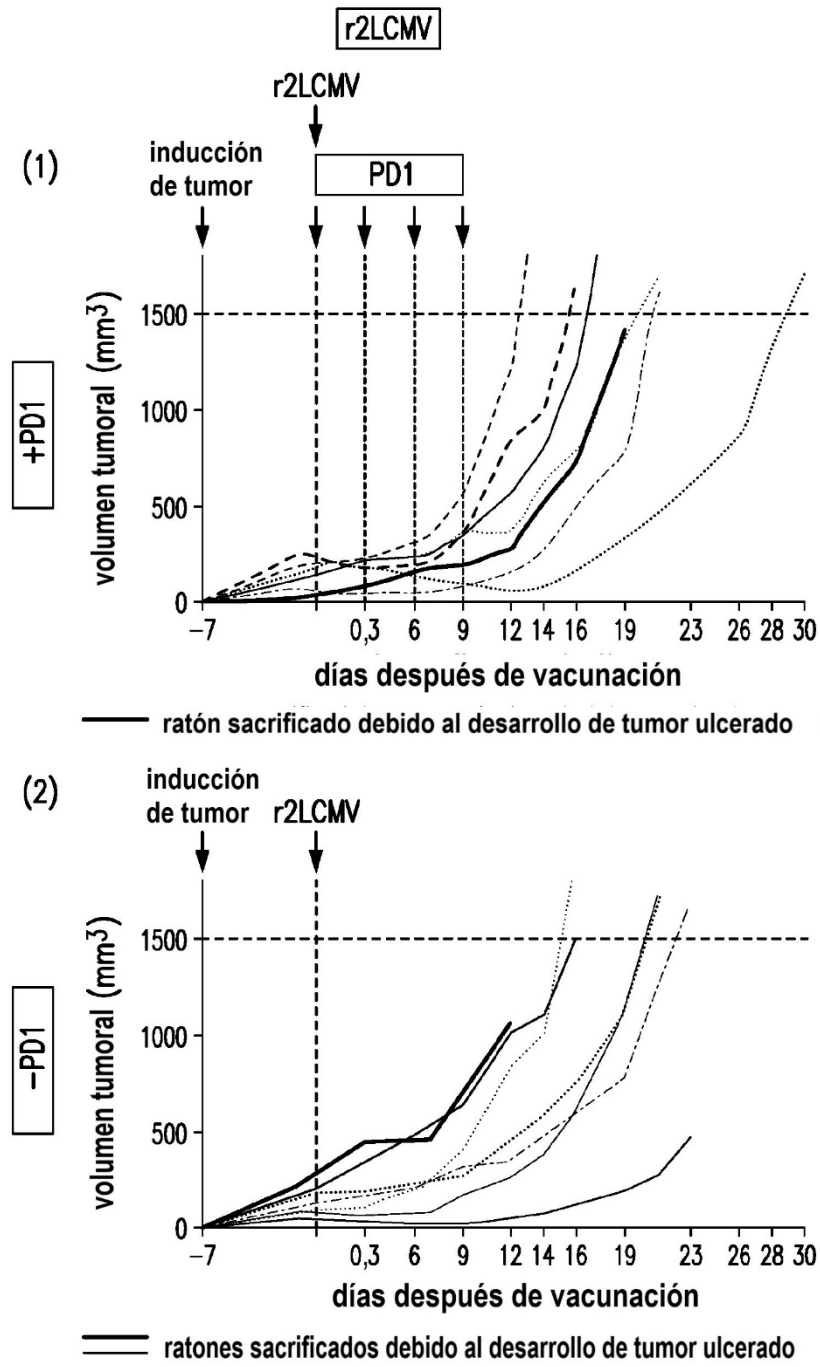


Fig. 3B



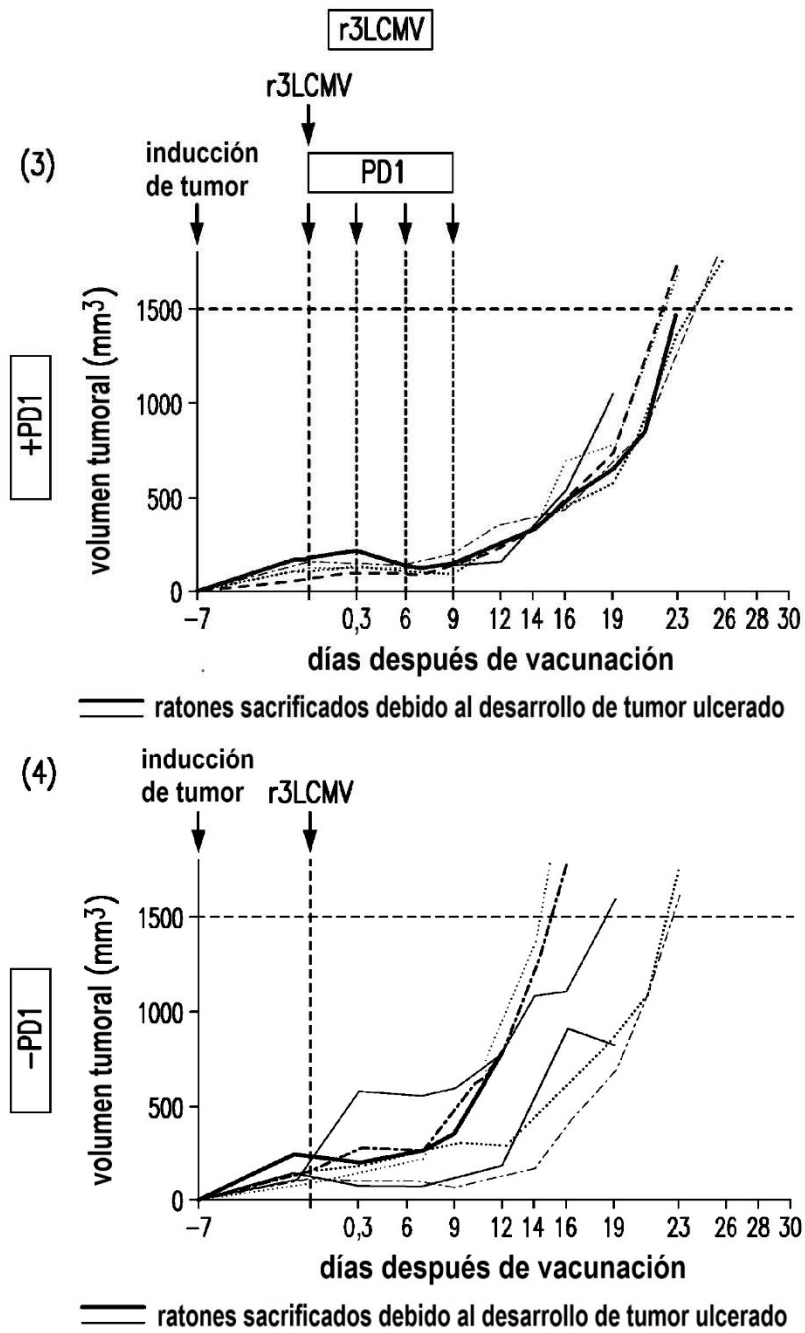
- Grupo 1: r2LCMV-Adpgk^{mut} + α-PD-1
- Grupo 2: r2LCMV-Adpgk^{mut}
- Grupo 3: r3LCMV-Adpgk^{mut} + α-PD-1
- Grupo 4: r3LCMV-Adpgk^{mut}
- Grupo 5: lampón + α-PD-1
- Grupo 6: lampón

Fig. 4A



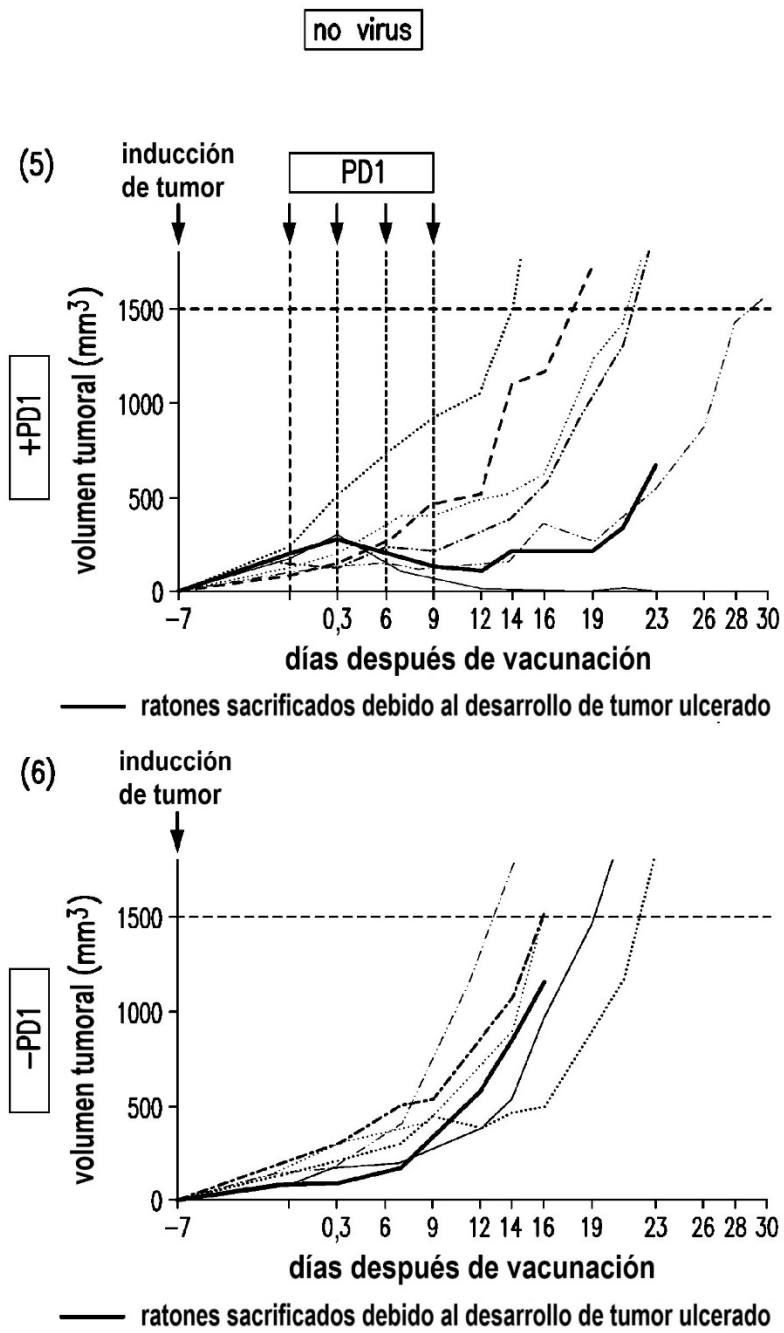
Los ratones se sacrificaron si el tumor alcanza un volumen $>1500 \text{ mm}^3$ o si ulcera la piel del ratón (1)-(6): grupos de ratones

FIG. 4B



Los ratones se sacrificaron si el tumor alcanza un volumen >1500 mm³ o si ulcera la piel del ratón (1)-(6): grupos de ratones

FIG. 4B Continuación



Los ratones se sacrificaron si el tumor alcanza un volumen >1500 mm³ o si ulcera la piel del ratón (1)-(6): grupos de ratones

FIG. 4B Continuación

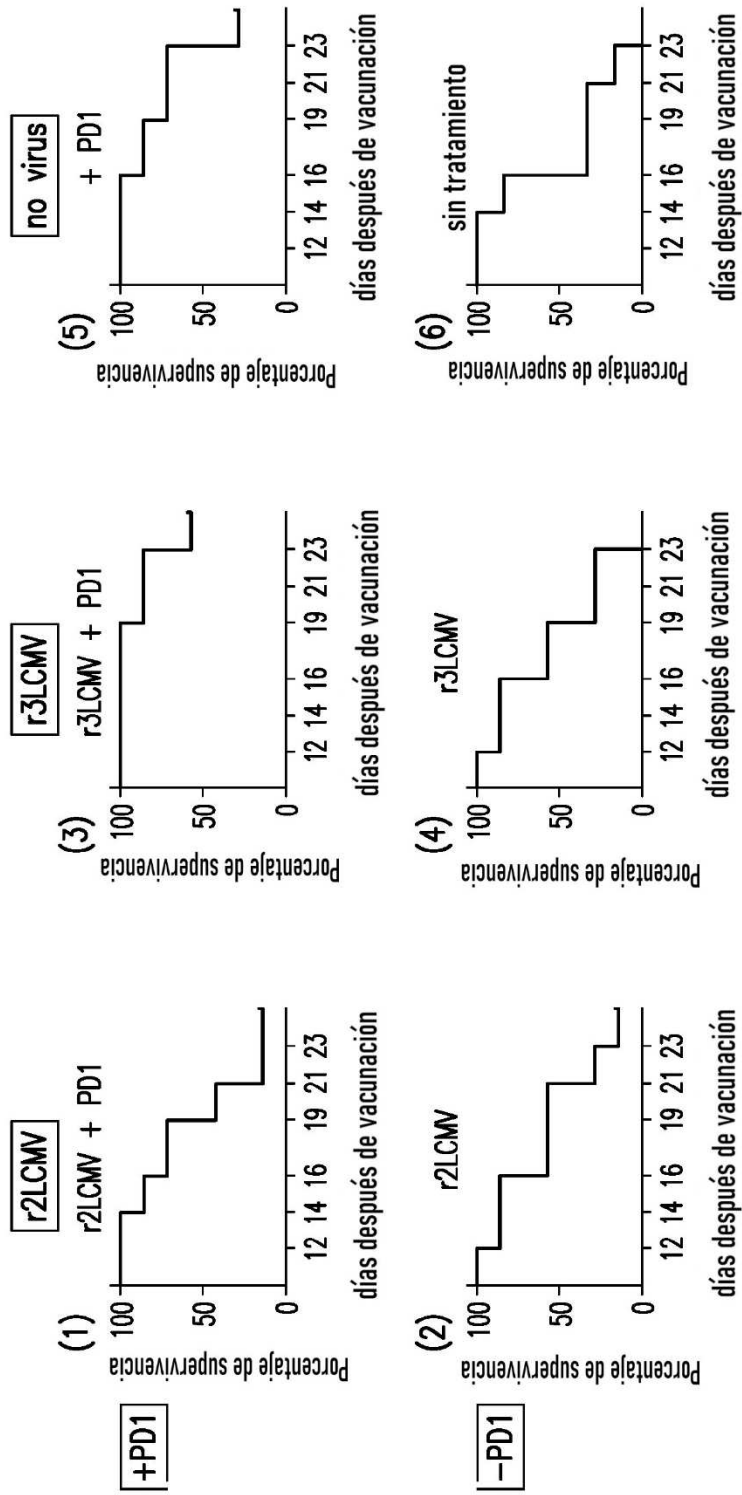


FIG. 4C

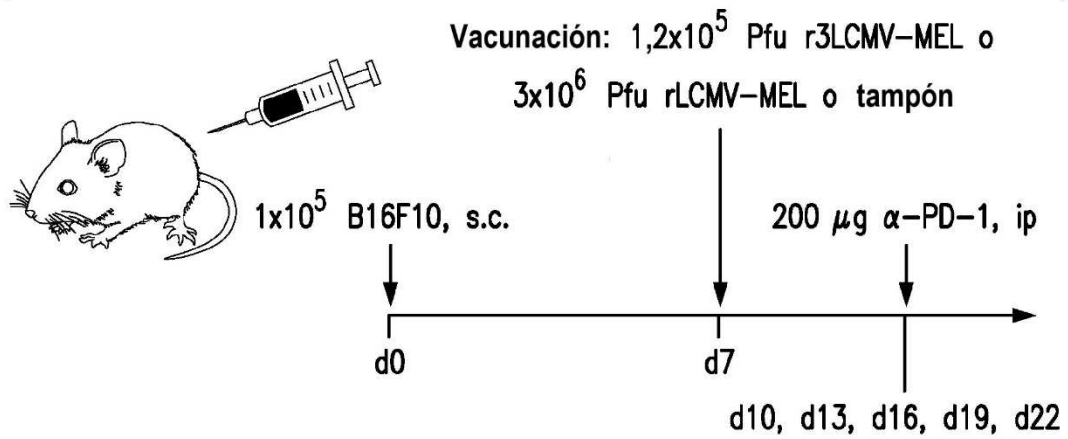


FIG. 5A

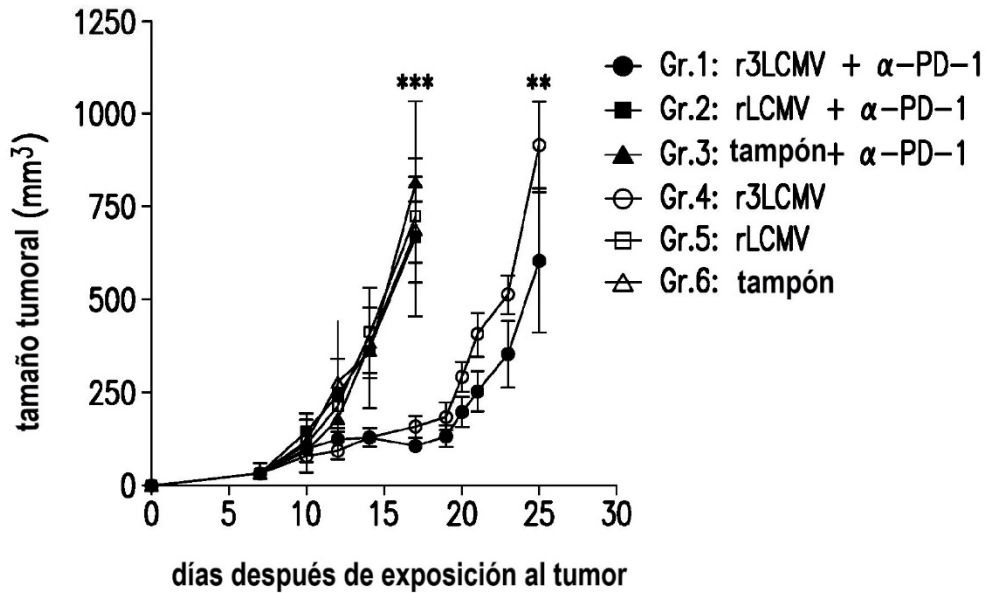


FIG. 5B

- Gr.1: r3LCMV + α -PD-1
- Gr.2: rLCMV + α -PD-1
- ▲ Gr.3: tampón+ α -PD-1
- Gr.4: r3LCMV
- Gr.5: rLCMV
- △ Gr.6: tampón

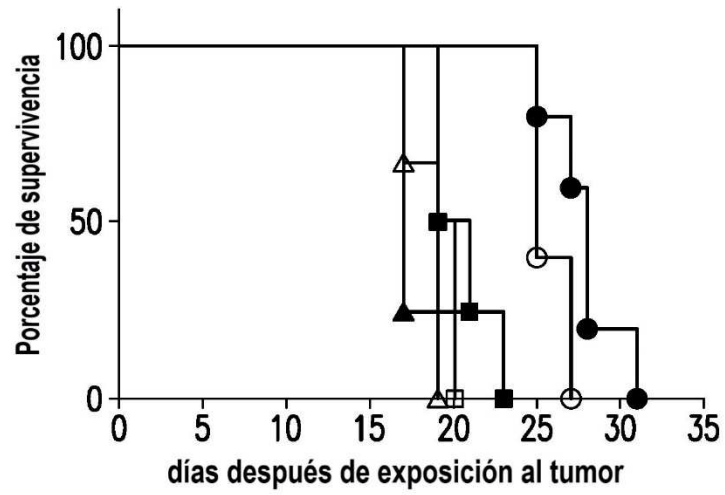


FIG. 5C

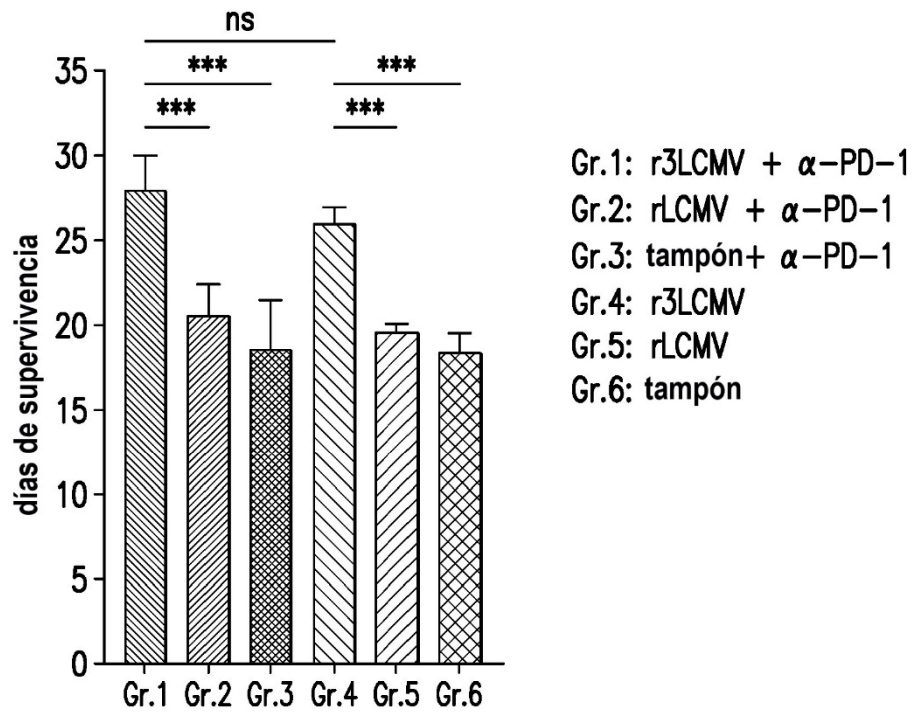


FIG. 5D