

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 746 150**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.09.2015 PCT/US2015/051337**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.03.2016 WO16048949**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.09.2015 E 15772173 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2019 EP 3198008**

54 Título: **Sistema de genética inversa para el virus Pichindé y métodos de uso**

30 Prioridad:

22.09.2014 US 201462053443 P

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

04.03.2020

73 Titular/es:

**REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MINNESOTA
(100.0%)**

**600 McNamara Alumni Center, 200 Oak St. SE
Minneapolis, MN 55455, US**

72 Inventor/es:

**LY, HINH y
LIANG, YUYING**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 746 150 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

Sistema de genética inversa para el virus Pichindé y métodos de uso

5 Antecedentes

La familia de los arenavirus incluye un grupo de virus de ARN bisegmentado envueltos con genomas que codifican un total de cuatro genes en orientación opuesta (Buchmeier *et al.*, 2007, págs. 1791-1827. En Knipe DM, Howley PM (ed.), Fields Virology, 5ª ed. Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, PA). La proteína Z producida a partir del segmento genómico grande (L) es una pequeña proteína de matriz que contiene un dominio RING que media la gemación del virus y también regula la síntesis de ARN vírico. La proteína L grande (~200 kDa), codificada también en el segmento L, es la proteína ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp, forma siglada de *RNA-dependent RNA polymerase*), que es necesaria para la síntesis de ARN vírico. La glucoproteína (GPC), codificada en el segmento pequeño (S), se procesa postraduccionalmente en un péptido señal estable (SSP), la proteína G1 de unión a receptor y la proteína transmembrana G2. La nucleoproteína (NP) del segmento S que encapsida los ARN genómicos víricos, es necesaria para la síntesis de ARN vírico, y además suprime las respuestas inmunitarias innatas del hospedador.

Los arenavirus son virus de ARN zoonóticos, que tienen a los roedores como sus principales hospedadores naturales (para una revisión, véase McLay *et al.*, 2014, J Gen Virol 95(Pt 1):1-15). Los humanos pueden infectarse con arenavirus a través del contacto directo de lesiones cutáneas con excreciones de roedores, al comer alimentos contaminados con excreciones de roedores o por inhalación de aerosoles contaminados. Solo unos pocos arenavirus pueden provocar enfermedades en los seres humanos (para una revisión, véase McLay *et al.*, 2013, Antiviral Res 97:81-92). Por ejemplo, el virus de la coriomeningitis linfocítica (VCML, forma siglada de *lymphocytic choriomeningitis virus*) puede provocar enfermedades del sistema nervioso central, mientras que el virus de Lassa (LASV, forma siglada de *Lassa virus*) y varios otros arenavirus pueden provocar fiebres hemorrágicas que pueden posiblemente dar como resultado un choque terminal y la muerte. Hay disponibles opciones terapéuticas limitadas para tratar estas infecciones víricas. El único fármaco antiviral disponible (ribavirina) muestra algunos efectos beneficiosos, pero tiene muchos efectos secundarios y debe administrarse poco después de la infección, cuando la enfermedad a menudo se diagnostica erróneamente dado que los síntomas son graduales y similares a los de la gripe.

Debido al requisito de trabajar con arenavirus patógenos con una alta contención (NBS-4) y al costo asociado con el trabajo con primates no humanos, solo se han realizado estudios de vacunas limitados. Actualmente no hay vacunas para estos arenavirus patógenos, a excepción de Candid #1, que no está aprobada por la FDA pero que está disponible solo para el uso no autorizado contra el virus Junín, que provoca la fiebre hemorrágica argentina. Se han desarrollado varios sistemas seguros y convenientes para estudiar la replicación y patogénesis de los arenavirus en el laboratorio de NBS-2 convencional, tal como el sistema del modelo del virus Pichindé (Lan *et al.*, 2009, J Virol 83:6357-6362, Liang *et al.*, 2009, Ann N Y Acad Sci 1171 Supl. 1:E65-74, Kumar *et al.*, 2012, Virology 433:97-103, Wang *et al.*, 2012, J Virol 86:9794-9801, McLay *et al.*, 2013, J Virol 87:6635-6643). El virus Pichindé (VPIC, del inglés *Pichinde virus*) se aisló de ratas de arrozal en Columbia. No provoca enfermedad en los seres humanos, pero puede provocar síntomas similares a la fiebre hemorrágica en cobayas y, por lo tanto, es un modelo sustituto ideal para estudiar las fiebres hemorrágicas inducidas por arenavirus. La evidencia serológica sugiere una seroprevalencia muy baja en seres humanos (2 de 82 personas que viven o trabajan en estrecha asociación con el hábitat de los roedores infectados y 6 de 13 trabajadores de laboratorio han presentado sueros positivos anti VPIC pero no enfermedades perceptibles (Trapido *et al.*, 1971, Am J Trop Med Hyg 20:631-641, Buchmeier *et al.*, 1974, Infect Immun 9:821-823). Por lo tanto, hay poca o ninguna inmunidad preexistente contra el VPIC en la población humana general, en contraste con el VCML, un arenavirus prototípico, que presenta el 2-5 % de seroprevalencia en seres humanos.

Resumen de la solicitud

En el presente documento se proporciona un virus Pichindé modificado por ingeniería genética que incluye tres segmentos genómicos ambisentido. El primer segmento genómico incluye una región codificante que codifica una proteína Z y una región codificante que codifica una proteína RdRp L. El segundo segmento genómico incluye una región codificante que codifica una nucleoproteína (NP) y un primer sitio de enzima de restricción. El tercer segmento genómico incluye una región codificante que codifica una glucoproteína y un segundo sitio de enzima de restricción. En una realización, la proteína NP incluye una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 80 % con la SEQ ID NO: 3. En una realización, la nucleoproteína incluye al menos una mutación que reduce la actividad de exorribonucleasa de la misma, en donde la mutación se selecciona de un ácido aspártico en aproximadamente el aminoácido 380, un ácido glutámico en aproximadamente el aminoácido 382, un ácido aspártico en aproximadamente el aminoácido 525, una histidina en aproximadamente el aminoácido 520 y un ácido aspártico en aproximadamente el aminoácido 457, en donde el ácido aspártico, el ácido glutámico o la histidina se sustituye por cualquier otro aminoácido. En una realización, la nucleoproteína incluye al menos una mutación que modifica la actividad de glucoproteína, en donde la mutación se selecciona de una asparagina en aproximadamente el aminoácido 20 y una asparagina en aproximadamente el aminoácido 404, y en donde la asparagina se sustituye por cualquier otro aminoácido. D, E o H se sustituyen por cualquier otro aminoácido.

En una realización, el segundo segmento genómico incluye un sitio de clonación múltiple, y el primer sitio de enzima

de restricción es parte del sitio de clonación múltiple. El segundo segmento genómico puede incluir adicionalmente una región codificante que codifica una primera proteína insertada en el primer sitio de restricción. En una realización, el tercer segmento genómico incluye un sitio de clonación múltiple, y el segundo sitio de enzima de restricción es parte del sitio de clonación múltiple. En una realización, el tercer segmento genómico puede incluir adicionalmente una región codificante que codifica una segunda proteína insertada en el primer sitio de restricción. En una realización, el segundo segmento genómico incluye adicionalmente una región codificante que codifica una primera proteína insertada en el primer sitio de restricción, y el tercer segmento genómico incluye adicionalmente una región codificante que codifica una segunda proteína insertada en el primer sitio de restricción. En una realización, la primera proteína y la segunda proteína se seleccionan de un antígeno y un marcador de detección. En una realización, el antígeno es una proteína expresada por un patógeno vírico, un patógeno procarionta o un patógeno eucariota. La primera proteína y la segunda proteína pueden ser iguales o distintas.

Además, en el presente documento se proporciona una colección de vectores. En una realización, los vectores son plásmidos. La colección incluye un primer vector que codifica un primer segmento genómico que incluye una región codificante que codifica una proteína Z y una región codificante que codifica una proteína RdRp L, en donde el primer segmento genómico es antigenómico, un segundo vector que codifica un segundo segmento genómico que incluye una región codificante que codifica una nucleoproteína (NP) y un primer sitio de enzima de restricción, en donde el segundo segmento genómico es antigenómico, y un tercer vector que codifica un tercer segmento genómico que incluye una región codificante que codifica una glucoproteína y un segundo sitio de enzima de restricción, en donde el tercer segmento genómico es antigenómico. En una realización, la proteína NP incluye una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 80 % con la SEQ ID NO: 3.

En una realización, el segundo segmento genómico incluye un sitio de clonación múltiple, y el primer sitio de enzima de restricción es parte del sitio de clonación múltiple. El segundo segmento genómico puede incluir adicionalmente una región codificante que codifica una primera proteína insertada en el primer sitio de restricción. En una realización, el tercer segmento genómico incluye un sitio de clonación múltiple, y el segundo sitio de enzima de restricción es parte del sitio de clonación múltiple. En una realización, el tercer segmento genómico puede incluir adicionalmente una región codificante que codifica una segunda proteína insertada en el primer sitio de restricción. En una realización, el segundo segmento genómico incluye adicionalmente una región codificante que codifica una primera proteína insertada en el primer sitio de restricción, y el tercer segmento genómico incluye adicionalmente una región codificante que codifica una segunda proteína insertada en el primer sitio de restricción. En una realización, la primera proteína y la segunda proteína se seleccionan de un antígeno y un marcador de detección. En una realización, el antígeno es una proteína expresada por un patógeno vírico, un patógeno procarionta o un patógeno eucariota. La primera proteína y la segunda proteína pueden ser iguales o distintas.

Adicionalmente, se proporcionan métodos. En una realización, un método incluye fabricar un virus Pichindé modificado por ingeniería genética como se describe en el presente documento. El método incluye introducir en una célula la colección de vectores descritos en el presente documento, e incubar las células en un medio en condiciones adecuadas para la expresión y el empaquetamiento del primer, segundo y tercer segmentos genómicos en una partícula vírica. El método también puede incluir aislar del medio una partícula de virus infecciosa.

Además, en el presente documento se proporciona un sistema de genética inversa para fabricar un virus Pichindé modificado por ingeniería genética, en donde el sistema incluye tres vectores. El primer vector codifica un primer segmento genómico que incluye una región codificante que codifica una proteína Z y una región codificante que codifica una proteína RdRp L, en donde el primer segmento genómico es antigenómico, el segundo vector codifica un segundo segmento genómico que incluye una región codificante que codifica una nucleoproteína (NP) y un primer sitio de enzima de restricción, en donde el segundo segmento genómico es antigenómico, y el tercer vector codifica un tercer segmento genómico que incluye una región codificante que codifica una glucoproteína y un segundo sitio de enzima de restricción, en donde el tercer segmento genómico es antigenómico. En una realización, la proteína NP incluye una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 80 % con la SEQ ID NO: 3.

En una realización, un método incluye el uso de un sistema de genética inversa, que incluye introducir en una célula de tres vectores de los segmentos genómicos descritos en el presente documento, incubar la célula en condiciones adecuadas para la transcripción de los tres segmentos genómicos y la expresión de las regiones codificantes de cada segmento genómico. En una realización, el método también incluye aislar partículas de virus infecciosas producidas por la célula, en donde cada partícula de virus infecciosa incluye los tres segmentos genómicos. En una realización, la introducción incluye transfectar una célula con los tres segmentos genómicos. En una realización, la introducción incluye poner en contacto la célula con una partícula de virus infecciosa que incluye los tres segmentos genómicos. En una realización, la célula es *ex vivo*, tal como una célula de vertebrado. En una realización, la célula de vertebrado puede ser una célula de mamífero, tal como una célula humana, o la célula de vertebrado puede ser una célula aviar, tal como un fibroblasto embrionario de pollo.

En una realización, un método incluye producir una respuesta inmunitaria en un sujeto. El método incluye administrar a un sujeto una partícula de virus infecciosa descrita en el presente documento, en donde el segundo segmento genómico incluye una región codificante que codifica un primer antígeno, y el tercer segmento genómico incluye adicionalmente una región codificante que codifica un segundo antígeno. En una realización, la célula es *ex vivo*, tal

como una célula de vertebrado. En una realización, la célula de vertebrado puede ser una célula de mamífero, tal como una célula humana, o la célula de vertebrado puede ser una célula aviar. La respuesta inmunitaria puede incluir una respuesta inmunitaria humoral, una respuesta inmunitaria mediada por células, o una combinación de las mismas. En una realización, el antígeno es una proteína expresada por un patógeno vírico, un patógeno procarionta o un patógeno eucariota, o un fragmento del mismo. El sujeto puede haber estado expuesto o está en riesgo de exposición al patógeno vírico, el patógeno procarionta o el patógeno eucariota. En una realización, la administración incluye administrar al menos dos poblaciones de partículas de virus infecciosas, en donde cada población de partículas de virus infecciosas codifica un antígeno distinto.

Además, en el presente documento se proporciona una partícula de virus infecciosa como se describe en el presente documento, y una composición que incluye una partícula de virus infecciosa descrita en el presente documento.

Breve descripción de las figuras

- Figura 1. Diagrama del sistema de genética inversa de VPIC de 2 plásmidos (Lan *et al.*, 2009, J Virol 83:6357-6362).
- Figura 2. El sistema de 3 plásmidos para generar VPIC - rP18tri-GFP trisegmentado infeccioso.
- Figura 3. Caracterización del virus rP18tri-GFP. Las células A549 o BHK-21 se infectaron con el virus rP18tri-GFP durante 24 horas, y se detectó la expresión de GFP en las células infectadas. Se recogieron sobrenadantes de virus y se usaron para infectar un cultivo reciente de células BHK-21, en el que también se detectó la expresión de GFP.
- Figura 4. Comparación del crecimiento de virus de virus rP2, rP18, trisegmentado rP18tri-GFP y rP18tri-RLuc en células BHK-21 a una *moi* alto (*moi* = 0,5) y bajo (*moi* = 0,01).
- Figura 5. Generación de VPIC trisegmentado portador de antígeno HA o NP del virus de la gripe.
- Figura 6. Detección de la expresión del producto del gen indicador GFP y de las proteínas HA o NP del virus de la gripe que se expresaron a partir de los vectores de vacuna basados en rP18tri.
- Figura 7. Las vacunas para la gripe basadas en rP18tri confieren inmunidad protectora en ratones. 1e5, 1x10⁵; 2e4, 2x10⁴; IP, intraperitoneal.
- Figura 8. Títulos de IHA inducidos por las vacunas para la gripe basadas en rP18tri.
- Figura 9. Títulos de IHA inducidos por el virus rP18tri-GFP/HA a través de distintas vías de vacunación. IN, intranasal; IM, intramuscular; IP, intraperitoneal.
- Figura 10. Protección conferida por rP18tri-GFP/HA siguiendo distintas vías de vacunación.
- Figura 11. Análisis de las respuestas CTL específicas para NP mediante análisis de tetrámero de NP.
- Figura 12. Cinética de las respuestas de linfocitos T CD8+ suscitadas siguiendo distintas vías de vacunación.
- Figura 13. La vacuna confirió inmunidad y protección de larga duración. Se expusieron ratones C57BL6 a 10 DL₅₀ de A/PR/8 después de 1 o 2 meses del refuerzo con el vector de vacuna rP18tri-GFP/HA. A. Títulos de IH en el día 14 y el día 30 postsensibilización (dps), el día 30 y día 60 postrefuerzo (dpr). B. Título vírico en los pulmones a los 6 dpi. C. Porcentaje de pérdida de peso. D. Cortes de pulmón teñidos con HyE.
- Figura 14. Protección conferida por sensibilización con el vector de vacuna rP18tri-GFP/HA. A. Títulos de anticuerpos neutralizantes después de distintas dosificaciones de la vacunación con rP18tri-GFP/HA. B. Porcentaje de pérdida de peso. C. Cortes de pulmón teñidos con HyE.
- Figura 15. Tamaño de las placas y expresión de HA y NP a partir del rP18tri-HA/NP y del rP18tri-NP/HA
- Figura 16. Respuestas humorales y de linfocitos T inducidas por el vector que expresa antígenos dobles (HA y NP). A. Gráficas de FACS representativas para linfocitos T CD44+ CD8+ tetrámero de NP₃₃₆₊ en sangre de ratón el día 7 posvacunación. B. Frecuencias de linfocitos T CD8+ específicos para NP en sangre periférica analizada 7 días postsensibilización y 7 días posrefuerzo mediante tinción de tetrámero. C. Los títulos de anticuerpos neutralizantes de virus se determinaron usando el ensayo IH de sueros recogidos en distintos puntos de tiempo.
- Figura 17. Protección conferida por la vacuna basada en rP18tri que expresa tanto la HA como NP del virus de la gripe. A. Cortes teñidos de pulmón de animales vacunados con una sensibilización-refuerzo de rP18tri-GFP/GFP, rP18tri-HA/NP o rP18tri-NP/HA. B. Título de virus en los pulmones. C. Porcentaje de pérdida de peso después del desafío con PR8.
- Figura 18. Respuesta humoral en ratones C57BL6 y ratones Balb/c inducida por la vacuna de vector basada en rP18tri que expresa proteínas HA de los subtipos de virus de la gripe H1N1 y H3N2. Los ratones se inocularon por vía intramuscular dos veces con un intervalo de 2 semanas entre la sensibilización y el refuerzo, ya sea con rP18tri-GFP/GFP o con 10⁴ ufp de rP18tri-GFP/HA, rP18tri-GFP/HA3 y rP18tri-HA/HA3. Dos semanas después del refuerzo, se recogieron muestras de suero y se analizaron en cuanto a los títulos de IH frente a los virus de exposición PR8 (H1N1) y X31 (H3N2). Δ representa el título de IH después de 2 semanas de sensibilización y ● representa el título de IH después de 2 semanas de refuerzo. Panel izquierdo: Título de IH en ratones C57BL6. Panel derecho: Título de IH en ratones Balb/c.
- Figura 19. Protección frente a la exposición doble con virus de la gripe. Los ratones se vacunaron con 10⁴ ufp/ml de rP18tri-HA/HA3. Cinco o seis días después de la exposición al virus, se determinaron los títulos de virus en los pulmones. A. La gráfica muestra los títulos víricos cuando se desafió con el virus de la gripe PR8 o el X31. B. Pérdida de peso después de la exposición a 10 DL₅₀ de A/PR/8 o 10⁵ ufp de X31. C. Cortes de pulmón teñidos con H y E recogidos 6 días después de la exposición a 10 DL₅₀ del virus A/PR/8 y 10⁵ ufp de X31.
- Figura 20. El vector rP18tri induce respuestas CTL más fuertes después del refuerzo
- Figura 21. Los virus mutantes para NP RNasa recombinantes indujeron la producción de IFN tipo I en células

infectadas. (A) Las mutaciones de sustitución de alanina en cada uno de los 5 restos catalíticos abolieron la capacidad de la NP del VPIC para suprimir la activación de IFN β inducida por el virus Sendai (Qi *et al.*, 2010, Nature 468:779-783). Se transfectaron células 293T con un plásmido de LUC dirigido por el promotor de IFN β y el plásmido de β -gal, junto con un vector vacío o los respectivos plásmidos de NP, seguido de la infección por el virus Sendai. La actividad de LUC se midió y normalizó en cuanto a la eficacia de transfección mediante la actividad de β -gal. Los resultados mostrados son el promedio de tres experimentos independientes. La expresión de las proteínas NP de TS (rP2 y rP18) y mutantes se detectó mediante transferencia Western usando anticuerpo anti myc. (B) Los virus VPIC mutantes para RNasa recombinantes produjeron altos niveles de IFN tipo I tras la infección viral. Se infectaron células A549 de forma simulada o se infectaron con los respectivos virus VPIC recombinantes a una MOI de 1. Se recogieron los sobrenadantes a las 12 y 24 hpi, Se trataron con UV para inactivar partículas víricas y sometieron al ensayo biológico basado en rNDV-GFP para medir el nivel de IFN. Se muestran imágenes representativas de GFP (B) y los valores promedio de GFP con las desviaciones típicas de tres experimentos independientes (C).

Figura 22. La actividad RNasa de la NP es necesaria para la replicación del VPIC en células competentes para IFN *in vitro* y la infección por VPIC *in vivo*. (A) Cinética del crecimiento vírico en células Vero defectuosas para IFN y células A549 competentes para IFN. Las células se infectaron con los respectivos virus a una MOI de 0,01. En distintos momentos posinfección, se cuantificaron en los sobrenadantes los títulos de virus mediante ensayo de placas. Los resultados mostrados son el promedio de tres experimentos independientes. (B) Tasa de supervivencia (panel izquierdo) y el peso corporal normalizado (panel derecho) de cobayas (n=6) infectadas con los respectivos virus VPIC recombinantes. Los análisis estadísticos de las curvas de supervivencia se realizaron utilizando la prueba del orden logarítmico (Mantel-Cox) χ^2 utilizando el programa informático GraphPad prism 5. ***, p < 0,001. **, p < 0,01. El peso corporal de cada animal se controló a diario y se normalizó con respecto al día 0. Los resultados mostrados son el promedio del peso corporal normalizado para cada grupo.

Figura 23. Los mutantes NP RNasa de VPIC indujeron fuertes respuestas de IFN para bloquear el establecimiento de la infección por virus. Se infectaron cobayas por vía i.p. con 1×10^4 ufp de los respectivos virus recombinantes (n=3 animales por grupo virus) durante 1 y 3 días. (A) Títulos víricos en los hígados y bazo a 1 y 3 dpi. (B) En el día 1 se midieron por qRT-PCR los niveles de IFN tipo I y de los genes selectivos estimulantes de interferón (los GEI) en las células de la cavidad peritoneal. Se proporcionarán las secuencias de los cebadores bajo pedido. Cada punto representa un solo animal. Los análisis estadísticos se realizaron mediante la prueba t de Student.

Figura 24. Generación de rP18tri que expresa antígenos dobles HA y NP del virus de la gripe. (A) Diagrama esquemático de los vectores rP18tri que expresan antígenos dobles HA y NP del virus de la gripe A (VGA) A/PR8 en los segmentos de S1 y S2, rP18tri-P/H, y rP18tri-H/P. IGR, región intergénica. (B) Los vectores de antígeno doble rP18tri expresan tanto HA como NP, como se demuestra mediante el ensayo de inmunofluorescencia (EIF). (C) Análisis de la curva de crecimiento de los virus recombinantes que expresan los antígenos dobles en células BHK-21.

Figura 25. Los vectores de vacuna que expresan los antígenos dobles HA/NP pueden inducir inmunidad protectora en ratones. A un grupo de ratones C57BL6 (n=3) se le dio dos dosis de 1×10^4 ufp de los respectivos vectores rP18tri, y se lo expuso por vía intranasal (IN) a $10 \times \text{DLM}_{50}$ (dosis letal media) del virus de la gripe A/PR8 adaptado a ratón. Se muestran el peso corporal (A) y los títulos víricos en pulmón a los 3 y 6 dpi (B).

Figura 26. El vector de antígeno doble H1/H3 induce anticuerpos neutralizantes equilibrados para HA. (A) Diagrama esquemático de los vectores rP18tri que expresan eGFP y HA H1 (rP18tri-G/H1), eGFP y HA H3 (rP18tri-G/H3), y H1 y H3 (rP18tri-H3/H1). (B) El rP18tri-H3/H1 induce anticuerpos neutralizantes equilibrados frente a los subtipos de HA H1 y H3. Se inmunizaron grupos de ratones C57BL6 (paneles superiores) y Balb/c (paneles inferiores) con los respectivos vectores rP18tri (n>=3) dos veces a través de la vía IM. En sangre recogida a los 14 días postsensibilización y posrefuerzo, los niveles de anticuerpos neutralizantes se cuantificaron frente a A/PR8 (H1N1) y A/x31 (H3N2) a través de un ensayo IHA.

Figura 27. Inducción de anticuerpos neutralizantes heterosubtípicos mediante una estrategia de sensibilización y refuerzo con distintos subtipos de HA. (A) Diagrama esquemático de los vectores rP18tri que expresan NP de A/PR8 junto con HA H1 de A/PR8 (rP18tri-P/H1) o HA H3 de A/x31 (rP18tri-P/H3). (B) Los CTL específicos para NP aumentaron tras una dosis de refuerzo. Se sensibilizaron ratones C57BL6 con rP18tri-P/H1, se reforzaron con rP18tri-P/H3, y se reforzaron nuevamente con rP18tri-P/H1, en un intervalo de 14 días. Se cuantificaron los linfocitos T efectores específicos de NP 7 días después de la sensibilización (dps), después del 1^{er} refuerzo (dpr) y después del 2^o refuerzo (dps2) mediante el análisis de tetrámero de NP establecido. (C) Se cuantificaron mediante ensayo de IHA los anticuerpos neutralizantes frente a A/PR8 (H1), A/x31 (H3) y A/WSN (H1 heterosubtípica) después de la sensibilización y de los refuerzos.

Figura 28. El vector rP18tri puede inducir respuestas humorales y de linfocitos T a través de vía oral. Se inmunizaron grupos de ratones BL6 dos veces con el vector rP18tri-G (n=3) o rP18tri-P/H (n=4) a través de sonda oral. Se muestran los linfocitos T efectores específicos para NP (A) y los anticuerpos neutralizantes específicos para H1 (B) en diferentes días después de la sensibilización o el refuerzo. dps, días postsensibilización; dpr, días posrefuerzo.

Figura 29. El vector rP18tri inactivado puede inducir respuestas humorales y de linfocitos T. Se inmunizaron grupos de ratones C57BL6 dos veces con el vector rP18tri-G (n=3), rP18tri-P/H (n=3) inactivado con peróxido de hidrógeno y rP18tri-P/H vivo (n = 1), respectivamente. Se muestran los linfocitos T efectores específicos para NP (panel izquierdo) y los anticuerpos neutralizantes (derecha) a distintos días después de la inmunización. dps, días postsensibilización; dpr, días posrefuerzo.

Figura 30. El vector rP18tri no muestra virulencia en cobayas y puede proteger a los animales de una exposición

letal con el virus rP18 TS. (A) El rP18tri-G no provoca infecciones virulentas en cobayas. Grupos de cobayas Hartley (n=3) se infectaron de forma simulada (PBS) o se infectaron con rP18 TS (1×10^4 ufp) o rP18tri-G (1×10^6 ufp), a través de vía IP. El peso corporal se controló a diario y se normalizó con respecto al día 0 (panel izquierdo). La temperatura rectal se muestra a la derecha. (B) Las cobayas inmunizadas con rP18tri-G estaban protegidas frente al desafío letal con rP18. Se inmunizaron grupos de cobayas (n=3) con PBS o rP18tri-G a 1×10^4 ufp, a través de vía IP y, 14 días después, se expusieron a 1×10^4 ufp de virus rP18 TS. Se muestran el peso corporal normalizado (panel izquierdo) y la temperatura rectal (panel derecho). La temperatura por encima de 39,5 °C se considera febril.

10 Descripción detallada de las realizaciones ilustrativas

En el presente documento se proporciona un sistema de genética inversa para producir virus Pichindé modificado genéticamente. El sistema de genética inversa basado en virus Pichindé modificado genéticamente descrito en el presente documento tiene múltiples ventajas sobre otros sistemas de arnavirus. No se sabe que el virus Pichindé provoque enfermedades en seres humanos, y hay evidencias de que puede provocar infecciones humanas asintomáticas en un entorno de laboratorio. Por ejemplo, el 46 % del personal de laboratorio que trabaja con el virus tiene suero positivo pero no muestra una enfermedad perceptible (Buchmeier *et al.*, 2007, *Arenaviridae: the viruses and their replication*. En: Knipe y Howley (eds), *Fields Virology*. 5ª ed. Filadelfia, PA: Lippincott Williams & Wilkins. págs. 1791-1827). El virus Pichindé modificado descrito en el presente documento es más atenuado, en comparación con el virus parental utilizado en el estudio de infección humana informado por Buchmeier *et al.* El virus Pichindé modificado es genéticamente estable a través de pases seriados en cultivos celulares. No se sabe que las poblaciones humanas en general tengan una exposición previa al virus Pichindé, lo que lo convierte en un vector ideal para el desarrollo de vacunas debido a la falta de inmunidad preexistente contra este vector del virus Pichindé. Como se usa en el presente documento, "modificado genéticamente" y "modificado por ingeniería genética" se refiere a un virus Pichindé que se ha modificado y no se encuentra en ningún entorno natural. Por ejemplo, un virus Pichindé modificado genéticamente es uno en el que se ha introducido un polinucleótido exógeno, tal como un sitio de endonucleasa de restricción. Otro ejemplo de un virus Pichindé modificado genéticamente es uno que se ha modificado para incluir tres segmentos genómicos.

El sistema de genética inversa para este virus Pichindé modificado incluye tres segmentos genómicos. El primer segmento genómico incluye dos regiones codificantes, una que codifica una proteína Z y una segunda que codifica una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp L). El segundo segmento genómico incluye una región codificante que codifica una nucleoproteína (NP) y puede incluir al menos un sitio de enzima de restricción, tal como un sitio de clonación múltiple. El tercer segmento genómico incluye una región codificante que codifica una glucoproteína y puede incluir al menos un sitio de enzima de restricción, tal como un sitio de clonación múltiple. Una "región codificante" es una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína y, cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas, expresa la proteína codificada. Como se usa en el presente documento, el término "proteína" se refiere en términos generales a un polímero de dos o más aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. El término "proteína" también incluye moléculas que contienen más de una proteína unida por enlaces disulfuro, enlaces iónicos o interacciones hidrófobas, o complejos de proteínas que están unidas, covalente o no covalentemente, como multímeros (por ejemplo, dímeros, tetrámeros). Por lo tanto, los términos péptido, oligopéptido y polipéptido están incluidos en la definición de proteína, y estos términos se usan indistintamente. Debe entenderse que estos términos no connotan una longitud específica de un polímero de aminoácidos, no se pretende que impliquen o distingan si la proteína se produce utilizando técnicas recombinantes, síntesis química o enzimática, o si es de origen natural.

La proteína Z, la RdRp L, la proteína NP y la glucoproteína, son las codificadas por un virus Pichindé. La proteína Z es un dominio RING pequeño que contiene la proteína de matriz que media la gemación del virus y también regula la síntesis de ARN vírico. Un ejemplo de una proteína Z procedente de un virus Pichindé es la secuencia disponible en Genbank con el número de referencia ABU39910.1 (SEQ ID NO: 1). La proteína RdRp L es una ARN polimerasa dependiente de ARN que se precisa para la síntesis de ADN vírico. Un ejemplo de una RdRp L procedente de un virus Pichindé es la secuencia disponible en Genbank con el número de referencia ABU39911.1 (SEQ ID NO: 2). La proteína NP encapsida los ARN genómicos víricos, es necesaria para la síntesis de ARN vírico, y además suprime las respuestas inmunitarias innatas del hospedador. Un ejemplo de una proteína NP procedente de un virus Pichindé es la secuencia disponible en Genbank con el número de referencia ABU39909.1 (SEQ ID NO: 3). La glucoproteína se procesa postraduccionalmente en un péptido señal estable (SSP), la proteína G1 de unión a receptor y la proteína transmembrana G2. Un ejemplo de una glucoproteína procedente de un virus Pichindé es la secuencia disponible en Genbank con el número de referencia ABU39908.1 (SEQ ID NO: 4).

Otros ejemplos de proteínas Z, proteínas RdRp L, proteínas NP y de glucoproteína incluyen proteínas que tienen similitud estructural con una proteína codificada por un virus Pichindé, por ejemplo, la SEQ ID NO: 1, 2, 3 y/o 4. La similitud estructural de dos polipéptidos se puede determinar alineando los restos de los dos polipéptidos (por ejemplo, un polipéptido candidato y un polipéptido de referencia descritos en el presente documento) para optimizar el número de aminoácidos idénticos a lo largo de sus secuencias; para realizar el alineamiento se permiten huecos en una o ambas secuencias a fin de optimizar el número de aminoácidos idénticos, aunque, sin embargo, los aminoácidos en cada secuencia deben permanecer en su orden correcto. Un polipéptido de referencia puede ser un polipéptido descrito en el presente documento, tal como la SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4. El polipéptido candidato es el polipéptido que

se compara con el polipéptido de referencia. Puede aislarse un polipéptido candidato, por ejemplo, de una célula de un animal, tal como un ratón, o puede producirse utilizando técnicas recombinantes, o sintetizarse química o enzimáticamente. Se puede inferir un polipéptido candidato a partir de una secuencia de nucleótidos presente en el genoma de un virus Pichindé.

A menos que se modifique de otra manera como se describe en el presente documento, se puede llevar a cabo un análisis de comparación por parejas de secuencias de aminoácidos utilizando el programa Blastp del algoritmo de búsqueda suite-2sequences, como se describe en Tatiana *et al.*, (FEMS Microbiol Lett, 174, 247-250 (1999)) y que está disponible en el sitio web del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Se pueden usar los valores predeterminados para todos los parámetros de búsqueda de suite-2sequences, incluyendo los parámetros generales: umbral de espera = 10, tamaño de palabra = 3, consultas cortas = activadas; parámetros de puntuación: matriz = BLOSUM62, costos de hueco=existencia: 11 extensiones, ajustes de composición=ajuste de matriz de puntuación de composición condicional. Como alternativa, los polipéptidos se pueden comparar usando el algoritmo BESTFIT en el paquete GCG (versión 10.2, Madison WI).

En la comparación de dos secuencias de aminoácidos, la similitud estructural puede se puede denominar porcentaje de "identidad" o se puede denominar porcentaje de "similitud". "Identidad" se refiere a la presencia de aminoácidos idénticos. "Similitud" se refiere a la presencia no solo de aminoácidos idénticos sino también a la presencia de sustituciones conservativas. Una sustitución conservativa para un aminoácido en un polipéptido descrito en el presente documento puede seleccionarse de otros miembros de la clase a la que pertenece el aminoácido. Por ejemplo, se sabe en la técnica de la bioquímica de proteínas que un aminoácido que pertenece a un grupo de aminoácidos que tiene un tamaño o característica particular (tal como la carga, la hidrofobicidad y la hidrofiliidad) puede ser sustituido por otro aminoácido sin modificar la actividad de una proteína, particularmente en regiones de la proteína que no están directamente asociadas con la actividad biológica. Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y tirosina. Los aminoácidos polares neutros incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina. Los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Las sustituciones conservativas incluyen, por ejemplo, Lys por Arg y viceversa, para mantener una carga positiva; Glu por Asp y viceversa, para mantener una carga negativa; Ser por Thr, de forma que se mantenga un -OH libre; y Gln por Asn, para mantener un -NH₂ libre.

El experto reconocerá que la proteína Z representada en la SEQ ID NO: 1 se puede comparar con las proteínas Z de otros arenavirus, incluyendo el virus de Lassa (O73557.4), el VCML Armstrong (AAX49343.1) y el virus Junín (NP_899216.1) utilizando algoritmos fácilmente disponibles, tal como ClustalW, para identificar regiones conservadas de las proteínas Z. ClustalW es un programa de alineamiento de secuencias múltiples para ácidos nucleicos o proteínas, que produce alineamientos de secuencias múltiples biológicamente significativos de diferentes secuencias (Larkin *et al.*, 2007, ClustalW and ClustalX versión 2, Bioinformatics, 23(21):2947-2948). Usando esta información, el experto podrá predecir fácilmente, con una previsión razonable, que determinadas sustituciones conservativas en una proteína Z, tal como la SEQ ID NO: 1, no disminuirán la actividad del polipéptido.

El experto reconocerá que la proteína RdRp L representada en la SEQ ID NO: 2 se puede comparar con las proteínas RdRp L de otros arenavirus, incluyendo el virus de Lassa (AAT49002.1), el VCML Armstrong (AAX49344.1) y el virus Junín (NP_899217.1) utilizando algoritmos fácilmente disponibles, tal como ClustalW, para identificar regiones conservadas de las proteínas RdRp L. Usando esta información, el experto podrá predecir fácilmente, con una previsión razonable, que determinadas sustituciones conservativas en una proteína RdRp L, tal como la SEQ ID NO: 2, no disminuirán la actividad del polipéptido.

El experto reconocerá que la proteína NP representada en la SEQ ID NO: 3 se puede comparar con las proteínas NP de otros arenavirus, incluyendo el virus de Lassa (P13699.1), el VCML Armstrong (AAX49342.1) y el virus Junín (NP_899219.1) utilizando algoritmos fácilmente disponibles, tal como ClustalW, para identificar regiones conservadas de las proteínas NP. Usando esta información, el experto podrá predecir fácilmente, con una previsión razonable, que determinadas sustituciones conservativas en una proteína NP, tal como la SEQ ID NO: 3, no disminuirán la actividad del polipéptido.

El experto reconocerá que la glucoproteína representada en la SEQ ID NO: 4 se puede comparar con las glucoproteínas de otros arenavirus, incluyendo el virus de Lassa (P08669), el VCML Armstrong (AAX49341.1) y el virus Junín (NP_899218.1) utilizando algoritmos fácilmente disponibles, tal como ClustalW, para identificar regiones conservadas de las proteínas glucoproteínas. Usando esta información, el experto podrá predecir fácilmente, con una previsión razonable, que determinadas sustituciones conservativas en una proteína glucoproteína, tal como la SEQ ID NO: 4, no disminuirán la actividad del polipéptido.

Por lo tanto, como se usa en el presente documento, una proteína Z, una proteína RdRp L, una proteína NP o una glucoproteína del virus Pichindé incluye a aquellas con al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 %

de similitud de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos de referencia. Como alternativa, como se usa en el presente documento, una proteína Z, una proteína RdRp L, una proteína NP o una glucoproteína del virus Pichindé incluye a aquellas con al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos de referencia. A menos que se indique otra cosa, "proteína Z del virus Pichindé" "proteína RdRp L del virus Pichindé" "proteína NP del virus Pichindé" y "glucoproteína del virus Pichindé" se refieren a una proteína que tiene al menos el 80 % de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 4, respectivamente.

Una proteína Z, una proteína RdRp L, una proteína NP o una glucoproteína del virus de Pichindé que tiene similitud estructural con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4, respectivamente, tiene actividad biológica. Como se usa en el presente documento, "actividad biológica" se refiere a la actividad de la proteína Z, de la proteína RdRp L, de una proteína NP o de una glucoproteína, en la producción de una partícula de virus infecciosa. Se conoce el papel biológico que desempeña cada una de estas proteínas en la biogénesis de una partícula de virus infecciosa, así como se conocen ensayos para medir la actividad biológica de cada proteína.

En una realización, la proteína NP puede incluir una o más mutaciones. Una mutación en la proteína NP puede dar como resultado una proteína NP que continúa funcionando en la producción de partículas virales infecciosas, pero tiene una capacidad disminuida para suprimir la producción de determinadas citocinas por parte de una célula infectada con un virus Pichindé. Se espera que un virus Pichindé que tiene una capacidad disminuida para suprimir la producción de citocinas sea útil para potenciar una respuesta inmunitaria frente a un antígeno que codifica el virus. Los ejemplos de mutaciones incluyen el ácido aspártico en el resto 380, el ácido glutámico en el resto 382, el ácido aspártico en el resto 457, el ácido aspártico en el resto 525 y la histidina en el resto 520. Un experto en la materia reconoce que la ubicación precisa de estas mutaciones puede variar entre distintas proteínas NP, dependiendo de la presencia de pequeñas inserciones o deleciones en la proteína NP, por lo tanto, la ubicación precisa de una mutación es aproximada y puede variar en 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos.

En una realización, la mutación en la proteína NP puede ser el reemplazo del ácido aspártico, el ácido glutámico o la histidina en los restos 380, 382, 457, 525, y/o 520 por cualquier otro aminoácido. En una realización, la mutación puede ser la sustitución conservativa del ácido aspártico, el ácido glutámico o la histidina en los restos 380, 382, 457, 525 y/o 520. En una realización, la mutación puede ser el reemplazo del ácido aspártico, el ácido glutámico o la histidina en los restos 380, 382, 457, 525 y/o 520 por una glicina o una alanina. En una realización, la proteína NP puede incluir una mutación en una, dos, tres o cuatro de los restos 380, 382, 457, 525 o 520, y en una realización, la proteína NP puede incluir una mutación en los cinco restos.

En una realización, la glucoproteína puede incluir una o más mutaciones. Una mutación en la glucoproteína puede dar como resultado una glucoproteína que impide la propagación del virus *in vivo*. Los ejemplos de mutaciones incluyen la asparagina en el resto 20 y/o la asparagina en el resto 404. Un experto en la materia reconoce que la ubicación precisa de estas mutaciones puede variar entre distintas glucoproteínas, dependiendo de la presencia de pequeñas inserciones o deleciones en la glucoproteína, por lo tanto, la ubicación precisa de una mutación es aproximada y puede variar en 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos.

En una realización, la mutación en la glucoproteína puede ser el reemplazo del resto de asparagina 20 y/o 404 por cualquier otro aminoácido. En una realización, la mutación puede ser la sustitución conservativa del resto de asparagina 20 y/o 404. En una realización, la mutación puede ser el reemplazo del resto de asparagina 20 y/o 404 por una glicina o una alanina.

Las proteínas como se describen en el presente documento también pueden identificarse en términos del polinucleótido que codifica la proteína. Por lo tanto, la presente divulgación proporciona polinucleótidos que codifican una proteína como se describe en el presente documento o que hibridan, en condiciones de hibridación convencionales, con un polinucleótido que codifica una proteína como se describe en el presente documento, y con las complementarias de tales secuencias de polinucleótidos. Como se usa en el presente documento, el término "polinucleótido" se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sea ribonucleótidos o desoxinucleótidos, e incluye ADN y ARN monocatenarios o bicatenarios. Un polinucleótido puede incluir secuencias de nucleótidos que tienen diferentes funciones, incluyendo, por ejemplo, secuencias codificantes y secuencias no codificantes, tales como secuencias reguladoras. Se puede obtener un polinucleótido directamente de una fuente natural, o se puede preparar con la ayuda de técnicas recombinantes, enzimáticas o químicas. Un polinucleótido puede ser de topología lineal o circular. Un polinucleótido puede ser, por ejemplo, una porción de un vector, tal como un vector de expresión o clonación, o un fragmento. Un ejemplo de un polinucleótido es un segmento genómico.

Un ejemplo de un polinucleótido que codifica una proteína Z son los nucleótidos 85-372 de la secuencia disponible en Genbank con el número de referencia EF529747.1 (SEQ ID NO: 5), un ejemplo de un polinucleótido que codifica una proteína RdRp L es la complementaria de los nucleótidos 443-7027 de la secuencia disponible en Genbank con el número de referencia EF529747.1 (SEQ ID NO: 5), un ejemplo de un polinucleótido que codifica una proteína NP es

la complementaria de los nucleótidos 1653..3338 de la secuencia disponible en Genbank con el número de referencia EF529746.1 (SEQ ID NO: 6), y un ejemplo de un polinucleótido que codifica una proteína glucoproteína son los nucleótidos 52-1578 de la secuencia disponible en Genbank con el número de referencia EF529746.1 (SEQ ID NO: 6). Debe entenderse que un polinucleótido que codifica una proteína Z, una proteína RdRp L, una proteína NP o una glucoproteína representada por la SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4, respectivamente, no se limita a la secuencia de nucleótidos descrita en la SEQ ID NO: 5 o 6, sino que también incluye la clase de polinucleótidos que codifican tales proteínas como resultado de la degeneración del código genético. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos de origen natural SEQ ID NO: 5 es solo un miembro de la clase de secuencias de nucleótidos que codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 y una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2. La clase de secuencias de nucleótidos que codifica una secuencia de proteína seleccionada es grande pero finita, y un experto en la materia puede determinar fácilmente la secuencia de nucleótidos de cada miembro de la clase haciendo referencia al código genético convencional, en donde se sabe que distintos tripletes de nucleótidos (codones) codifican el mismo aminoácido.

Como se usa en el presente documento, la referencia a un polinucleótido como se describe en el presente documento y/o la referencia a la secuencia de ácido nucleico de una o más SEQ ID NO pueden incluir polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia con una secuencia de polinucleótido identificada de referencia.

En este contexto, "identidad de secuencia" se refiere a la identidad entre dos secuencias de polinucleótidos. La identidad de secuencia generalmente se determina alineando las bases de los dos polinucleótidos (por ejemplo, alineando la secuencia de nucleótidos de la secuencia candidata y una secuencia de nucleótidos que incluye, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de la SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4), para optimizar el número de nucleótidos idénticos a lo largo de sus secuencias; para realizar el alineamiento se permiten huecos en una o ambas secuencias a fin de optimizar el número de nucleótidos compartidos, aunque, sin embargo, los nucleótidos en cada secuencia deben permanecer en su orden correcto. Una secuencia candidata es la secuencia que se compara con una secuencia conocida, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que incluye la secuencia de nucleótidos apropiada seleccionada de, por ejemplo, la SEQ ID NO: 5 o 6. Por ejemplo, se pueden comparar dos secuencias de polinucleótidos usando el programa Blastn del algoritmo de búsqueda BLAST 2, como se describe en Tatiana *et al.*, FEMS Microbiol Lett., 1999;174: 247-250, y disponible en la internet en ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/. Se pueden usar los valores predeterminados para todos los parámetros de búsqueda de BLAST 2, incluyendo recompensa por partido = 1, penalización por falta de coincidencia = -2, penalización por apertura de hueco = 5, penalización extensión de hueco = 2, disminución por hueco = 50, expectativa = 10, tamaño de palabra = 11, y filtro activado.

En una realización, el segundo y/o tercer segmentos genómicos pueden incluir cada uno, independientemente, un "sitio de clonación múltiple" con un sitio de restricción o más de un sitio de restricción.

En una realización, el segundo y/o tercer segmentos genómicos pueden incluir cada uno, independientemente, una región codificante adicional que codifique una proteína, tal como un antígeno. Por lo tanto, el segundo segmento genómico incluye la región codificante que codifica la nucleoproteína y puede incluir una segunda región codificante que codifique un antígeno. Asimismo, el tercer segmento genómico incluye la región codificante que codifica la glucoproteína y puede incluir una segunda región codificante que codifique un antígeno. El segundo y el tercer segmentos genómicos pueden codificar el mismo antígeno o antígenos distintos. Tanto en el segundo segmento genómico como en el tercer segmento genómico, esta segunda región codificante puede insertarse en un sitio de restricción presente, tal como un sitio de restricción presente en un sitio de clonación múltiple. La segunda región codificante que puede estar presente en el segundo segmento genómico y/o el tercer segmento genómico no pretende ser limitante.

En una realización, la segunda región codificante puede codificar una proteína que es útil como antígeno, que puede suscitar una respuesta inmunitaria en un sujeto. Los ejemplos 1, 2 y 3 muestran el uso de nucleoproteínas del virus de la gripe y hemaglutininas del virus de la gripe como antígenos modelo para demostrar la eficacia de los sistemas de genética inversa y de los virus divulgados aquí y, por consiguiente, la identidad del antígeno no pretende ser limitante. Un ejemplo de antígeno es una proteína de longitud completa codificada por una célula procariota, una célula eucariota (incluyendo, por ejemplo, un hongo, levadura o protozoo) o un virus, o un fragmento de la misma. En una realización, la proteína puede ser una que expresa de forma natural un patógeno, tal como un patógeno vírico, un patógeno procariota o un patógeno eucariota. Las proteínas antigénicas codificadas por una célula procariota, una célula eucariota o un virus, son conocidas para el experto en la materia. Otro ejemplo de un antígeno es una proteína técnicamente diseñada para incluir uno o más epítopos. En una realización, la proteína puede ser una que expresa una célula tumoral o que está presente en un ambiente tumoral.

Los ejemplos de patógenos procariotas a partir de los cuales se puede obtener un antígeno incluyen patógenos gramnegativos y patógenos grampositivos. Los ejemplos de patógenos gramnegativos incluyen enteropatógenos,

- tales como miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, incluyendo miembros de la familia *Enterobacteriaceae* que son miembros de la tribu *Escherichieae* o *Salmonelleae*. Los ejemplos de enteropatógenos incluyen miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, miembros de la familia *Vibrionaceae* (incluyendo, por ejemplo, *Vibrio cholerae*) y *Campylobacter* spp. (incluyendo, por ejemplo, *C. jejuni*). Los ejemplos de miembros preferentes de la familia *Enterobacteriaceae* incluyen, por ejemplo, *E. coli*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Proteus* spp., *Klebsiella* spp. (por ejemplo, *K. pneumoniae*), *Serratia* spp. y *Yersinia* spp. Los ejemplos de cepas de *E. coli* incluyen, por ejemplo, los serotipos de *E. coli* O1a, O2a, O78 y O157, distintos serotipos O:H, incluyendo 0104, 0111, 026, 0113, 091, cepas hemolíticas de *E. coli* enterotoxigénica, tales como K88+, F4+, F18ab+ y F18ac+, y cepas no hemolíticas tales como 987P, F41 y K99. Como se usa en el presente documento, el término "cepa" se refiere a los miembros de una especie de microbio en que los miembros tienen distintos genotipos y/o fenotipos. Otros ejemplos de *E. coli* incluyen cinco categorías de *Escherichia coli* diarreogénica, que provocan enfermedades transmitidas por los alimentos y por el agua en seres humanos: las cepas enteropatógenas (ECEP), enterohemorrágicas (ECEH), enterotoxigénicas (ECET), enteroinvasoras (ECEI) y enteroagregativas (ECEA). Otros microbios gramnegativos incluyen miembros de la familia *Pasteurellaceae*, preferentemente *Pasturella* spp., tal como *P. multocida* y *Mannheimia haemolytica*, y miembros de la familia *Pseudomonadaceae*, tal como *Pseudomonas* spp., incluyendo *P. aeruginosa*. Sin embargo, otros microbios gramnegativos incluyen *Bordetella* spp., *Burkholderia* spp., *Chlamydia* spp., *Enterobacter* spp., *Helobacter* spp., *Histophilus* spp., *Moraxella* spp., *Legionella* spp., *Leptospirilla* spp., *Rickettsia* spp., *Treponema* spp., *Neisseria* spp., *Actinobacillus* spp., *Haemophilus* spp., *Mycobacteria* spp., *Sporocytophaga* spp., *Chondrococcus* spp., *Cytophaga* spp., *Flexibacter* spp., *Flavobacterium* spp., *Aeromonas* spp. Los ejemplos de *Yersinia* spp. incluyen *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica*. Los ejemplos de *Fusobacterium* spp., perteneciente a la familia *Fusobacteriaceae*, incluyen a *F. necrophorum* (incluyendo las subespecies *F. necrophorum* subsp. *necrophorum* y *F. necrophorum* subsp. *funduliforme*), *F. nucleatum*, *F. canifelinum*, *F. gonidiaformans*, *F. mortiferum*, *F. naviforme*, *F. necrogenes*, *F. russii*, *F. ulcerans* y *F. variu*.
- Los ejemplos de patógenos grampositivos incluyen miembros de la familia *Micrococcaceae*, incluyendo *Staphylococcus* spp., tal como *S. aureus*. Otros patógenos grampositivos incluyen miembros de la familia *Deinococcaceae*, tal como *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equi*, *Streptococcus zooepidemicus* y *Streptococcus dysgalactiae*. Otros microbios grampositivos a partir de los cuales se puede obtener un antígeno incluyen *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., *Corynebacterium* spp., *Erysipelothrix* spp., *Listeria* spp., *Mycobacterium* spp., Otros patógenos grampositivos incluyen miembros de la familia *Corynebacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Micrococcaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Nocardiaceae* y *Peptococcaceae*, que incluyen especies bacterianas tales como *Actinomyces* spp., *Bifidobacterium* spp., *Enterococcus* spp., *Eubacterium* spp., *Kytococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Micrococcus* spp., *Mobiluncus* spp., *Mycobacteria* spp., *Peptostreptococcus* spp. y *Propionibacterium* spp., *Gardnerella* spp., *Mycoplasma*, *Nocardia* spp., *Streptomyces* spp., *Borrelia* spp. y *Bacillus* spp.
- Los ejemplos de protozoos patógenos incluyen protozoos intestinales, protozoos urogenitales, protozoos sistémicos y protozoos extraintestinales. Los ejemplos específicos incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, *Cystoisospora belli*, *Cyclospora cayetanensis*, miembros del filo *Microsporidia*, *Trichomonas vaginalis*, *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii*, miembros de la subclase *Coccidiosis*, tal como miembros del género *Eimeria*, incluyendo *E. acervulina*, *E. necatrix* y *E. tenella*, nematodos, trematodos y cestodos.
- Los ejemplos de patógenos víricos incluyen, pero sin limitación, a los miembros de la familia *Rhabdoviridae* (incluyendo el virus de la estomatitis vesicular VSV), miembros del género *Aphthovirus* (incluyendo el virus de la fiebre aftosa VFA), miembros del género *Pestivirus* (incluyendo el virus de la diarrea vírica bovina), miembros de la familia *Arterivirus* (incluyendo el virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino VSRRP, los coronavirus (incluyendo el virus de la diarrea epidémica porcina VDEP, CoVSRAG, CoVSRM), miembros del género *Torovirus* (incluyendo el torovirus equino), miembros de la familia *Orthomyxoviridae* (incluyendo el virus de la gripe), miembros de la familia *Reoviridae* (incluyendo, el virus de la enfermedad de la lengua azul, reovirus aviares), miembros de la familia de los circovirus, miembros de la familia *Herpesviridae*, miembros de la familia *Retroviridae* (incluyendo, el VIH, VIF, VIS, VLA, VLB, VSR), miembros de la familia *Asfarviridae* (incluyendo el virus de la peste porcina africana), miembros del género *Flavivirus* (incluyendo el virus del dengue, el virus de la fiebre amarilla), miembros de la familia *Paramyxoviridae* (incluyendo el virus de la enfermedad de Newcastle y el virus respiratorio sincicial VRS), así como miembros del género de los arenavirus (incluyendo miembros del complejo de los virus VCML-Lassa (Viejo Mundo) y el complejo del virus Tacaribe (Nuevo Mundo)). Los ejemplos específicos no limitantes de miembros del género de los arenavirus incluyen el virus de la coriomeningitis linfocítica, virus Pichindé, virus de Lassa, virus Mopeia, virus Junín, virus Guanarito, virus Lujo, virus Machupo, virus Sabiá y virus Whitewater Arroyo.
- En una realización, la proteína codificada por la segunda región codificante puede proceder de un virus de la gripe, tal como una nucleoproteína, una hemaglutinina, o una porción de las mismas. La nucleoproteína puede ser de cualquier subtipo, incluyendo, pero sin limitación, A/PR8 NP (por ejemplo, el número de referencia de Genbank NP 040982.1). La hemaglutinina puede ser de cualquier subtipo, incluyendo, pero sin limitación, HI y H3.
- La proteína codificada por la segunda región codificante puede ser una que da como resultado una respuesta inmunitaria humoral, una respuesta inmunitaria mediada por células, o una combinación de las mismas. En una

realización, la proteína codificada por la segunda región codificante de los segundo y tercer segmentos genómicos tiene al menos 6 aminoácidos de longitud. El antígeno puede ser heterólogo para la célula en la que se expresa la región codificante. Un experto en la materia puede determinar fácilmente la secuencia de nucleótidos de una segunda región codificante presente en un segundo y tercer segmento genómico, y que codifica el antígeno, por referencia al código genético convencional. La secuencia de nucleótidos de una segunda región codificante presente en un segundo y tercer segmento genómico, y que codifica el antígeno, puede modificarse para reflejar el sesgo de uso de codones de una célula en la que se expresará el antígeno. El experto conoce el sesgo de uso de casi todas las células en las que se expresaría un virus Pichindé.

En una realización, la segunda región codificante puede codificar una proteína que es útil como marcador de detección, por ejemplo, una molécula que se detecta fácilmente por diversos métodos. Los ejemplos incluyen polipéptidos fluorescentes (por ejemplo, proteínas fluorescentes verdes, amarillas, azules o rojas), luciferasa, cloranfenicol acetil transferasa y otras moléculas (tales como c-myc, flag, 6xhis, péptido de unión a metales HisGln (HQ) y epítipo V5) detectables por su fluorescencia, actividad enzimática o propiedades inmunológicas.

Cuando los segundo y/o tercer segmentos genómicos incluyen una región codificante que codifica un antígeno, el tamaño máximo en nucleótidos de la región (o regiones) codificante se determina considerando el tamaño total del segundo segmento genómico y el tercer segmento genómico. El tamaño total de los dos segmentos genómicos no puede ser mayor que 3,4 kilobases (kb), no mayor que 3,5 kb, no mayor que 3,6 kb, no mayor que 3,7 kb, no mayor que 3,8 kb, no mayor que 3,9 kb, no mayor que 4,0 kb, no mayor que 4,1 kb, no mayor que 4,2 kb, no mayor que 4,3 kb, no mayor que 4,4 kb o no mayor que 4,5 kb.

El virus Pichindé es un arnavirus, y una característica de un arnavirus es un genoma ambisentido. Como se usa en el presente documento, "ambisentido" se refiere a un segmento genómico que tiene porciones de sentido positivo y de sentido negativo. Por ejemplo, el primer segmento genómico de un virus Pichindé descrito en el presente documento es ambisentido, codificando una proteína Z en sentido positivo y codificando una proteína RdRp L en sentido negativo. Por lo tanto, una de las dos regiones codificante del primer segmento genómico está en una orientación de sentido positivo y la otra está en una orientación de sentido negativo. Cuando el segundo y/o el tercer segmento genómico incluyen una segunda región codificante que codifica un antígeno, la región codificante que codifica el antígeno tiene una orientación de sentido negativo en comparación con la proteína NP del segundo segmento genómico y con la glucoproteína del tercer segmento genómico.

Cada segmento genómico incluye también nucleótidos que codifican una región 5' no traducida (UTR) y una 3' UTR. Estos UTR se ubican en los extremos de cada segmento genómico. Los nucleótidos útiles como 5' UTR y 3' UTR son los presentes en el virus Pichindé y están fácilmente disponibles para el experto en la materia (véase, por ejemplo, Buchmeier *et al.*, 2007, *Arenaviridae: the viruses and their replication*. En: Knipe y Howley (eds), *Fields Virology*. 5ª ed. Filadelfia, PA: Lippincott Williams & Wilkins. págs. 1791-1827). En una realización, un segmento genómico que codifica una proteína Z y una proteína RdRp L incluye una secuencia 5' UTR que está 5' CGCACCGGGGAUCCUAGGCAUCUUUGGGUCACGCUCAAUUUUGUCCAAUUUGAACCCAGCUCUAGUCCUG GUCAAAACUUGGG (SEQ ID NO:8) y una secuencia 3' UTR que es CGCACCGAGGAUCCUAGGCAUUUCUUGAUC (SEQ ID NO:9). En una realización, un segmento genómico que codifica una proteína NP o una glucoproteína incluye una secuencia 5' UTR que es 5'CGCACCGGGGAUCCUAGGCAUACCUUGGACGCGCAUUAUACUUGAUCAAAG (SEQ ID NO:10) y una secuencia 3' UTR que es 5' CGCACAGUGGAUCCUAGGCGAUUCUAGAUCACGCGUACGUUCACUUCUUCACUG ACUCGGAGGAAGUGCAAACAACCCAAA (SEQ ID NO:11). Se permiten modificaciones en estas secuencias, y los 27-30 nucleótidos terminales están altamente conservados entre los segmentos genómicos.

Cada segmento genómico también incluye una región intergénica ubicada entre la región codificante que codifica una proteína Z y la región codificante que codifica una proteína RdRp L, entre la región codificante que codifica una nucleoproteína y el al menos un primer sitio de enzima de restricción, y entre la región codificante que codifica una glucoproteína y al menos un segundo sitio de enzima de restricción. Los nucleótidos útiles como región intergénica son los presentes en el virus Pichindé y están fácilmente disponibles para el experto en la materia. En una realización, una secuencia IGR de un segmento genómico que codifica una proteína Z y una proteína RdRp L incluye 5' ACCAGGGCCCCUGGGCGCACCCCCUCCGGGGGUGCGCCCGGGGGCCCCGGCCCC AUGGGGCCGGUUGUU (SEQ ID NO: 12). En una realización, una secuencia IGR de un segmento genómico que codifica una proteína N y una glucoproteína incluye 5' GCCCUAGCCUGACAUGGGCCUCGACGUCACUCCCAAUAGGGGAGUGACGUCGA GGCCUCUGAGGACUUGAGCU (SEQ ID NO:13).

En una realización, cada segmento genómico está presente en un vector. En una realización, la secuencia de un segmento genómico del vector es antigenómica, y en una realización, la secuencia de un segmento genómico del vector es genómica. Como se usa en el presente documento, "antigenómica" se refiere a un segmento genómico que codifica una proteína en la orientación opuesta al genoma vírico. Por ejemplo, el virus Pichindé es un virus de ARN de sentido negativo. Sin embargo, cada segmento genómico es ambisentido, codificando proteínas en las orientaciones de sentido positivo y sentido negativo. "Antigenómica" se refiere a la orientación de sentido positivo, mientras que "genómica" se refiere a la orientación de sentido negativo.

Un vector es un polinucleótido replicante, tal como un plásmido, un fago o un cósmido, al que puede unirse otro polinucleótido para provocar la replicación del polinucleótido unido. La construcción de vectores que contienen un segmento genómico, y la construcción de segmentos genómicos, incluyendo la inserción de un polinucleótido que codifica un antígeno, emplea técnicas de ligamiento convencionales conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) o Ausubel, R.M., ed. Current Protocols in Molecular Biology (1994). Un vector puede proporcionar, adicionalmente, clonación (amplificación del polinucleótido), es decir, un vector de clonación, o la expresión de un ARN codificado por el segmento genómico, es decir, un vector de expresión. El término vector incluye, pero sin limitación, vectores plasmídicos, vectores víricos, vectores cosmídicos o vectores cromosómicos artificiales. Normalmente, un vector es capaz de replicar en una célula procariota y/o una célula eucariota. En una realización, el vector replica en células procariotas, y no en células eucariotas. En una realización, el vector es un plásmido.

La selección de un vector depende de una diversidad de características deseadas de la construcción resultante, tal como un marcador de selección, una tasa de replicación del vector y similares. Las células hospedadoras adecuadas para clonar o expresar los vectores en el presente documento son células procariotas o eucariotas.

Un vector de expresión opcionalmente incluye secuencias reguladoras unidas operativamente al segmento genómico. La expresión "unido operativamente" se refiere a una yuxtaposición de componentes, de forma que están en una relación que les permite funcionar en su manera prevista. Una secuencia reguladora está "operativamente unida" a un segmento genómico cuando se está unida de tal manera que la expresión del segmento genómico se logra en condiciones compatibles con la secuencia reguladora. Un promotor es secuencia reguladora, que actúa como una señal reguladora que se une a la ARN polimerasa para iniciar la transcripción del segmento genómico cadena abajo (dirección 3'). El promotor utilizado puede ser un promotor constitutivo o inducible. La invención no está limitada por el uso de ningún promotor particular, y se conoce una amplia variedad de los mismos. En una realización, se utiliza un promotor T7. Otra secuencia reguladora es un terminador de la transcripción ubicado cadena abajo del segmento genómico. Se puede usar cualquier terminador de la transcripción que actúe para detener la transcripción de la ARN polimerasa que inicia la transcripción en el promotor. En una realización, cuando el promotor es un promotor T7, también se utiliza un terminador de la transcripción T7. En una realización, está presente una ribozima para ayudar en el procesamiento de una molécula de ARN. Puede estar presente una ribozima después de las secuencias que codifican el segmento genómico y antes de un terminador de la transcripción. Un ejemplo de una ribozima es una ribozima del virus de la hepatitis delta. Un ejemplo de una ribozima del virus de la hepatitis delta es 5' AGCTCTCCCTTAGCCATCCGAGTGGACGACGTCTCCTTCGGATGCCAGGTCGGAC CGCGAGGAGGTGGAGATGCCATGCCGACCC (SEQ ID NO:14).

La transcripción de un segmento genómico presente en un vector da como resultado una molécula de ARN. Cuando cada uno de los tres segmentos genómicos está presente en una célula, las regiones codificantes de los segmentos genómicos se expresan y se producen partículas víricas que contienen una copia de cada uno de los segmentos genómicos. Los tres segmentos genómicos del sistema de genética inversa descritos en el presente documento se basan en el virus Pichindé, un arnavirus con un genoma segmentado de dos ARN ambisentido monocatenarios. Si bien la capacidad del sistema de genética inversa para replicar y producir virus infeccioso normalmente precisa la presencia de los ARN ambisentido en una célula, los segmentos genómicos descritos en el presente documento también incluyen los complementarios de los mismos (es decir, ARN complementario) y las secuencias de ADN correspondientes de las dos secuencias de ARN.

El polinucleótido usado para transformar una célula hospedadora incluye, opcionalmente, una o más secuencias marcadoras, que normalmente codifican una molécula que inactiva o detecta o es detectada por un compuesto en el medio de cultivo. Por ejemplo, la inclusión de una secuencia marcadora puede hacer que la célula transformada sea resistente a un antibiótico, o puede conferir un metabolismo específico de compuesto a la célula transformada. Los ejemplos de una secuencia marcadora son secuencias que confieren resistencia a la kanamicina, ampicilina, cloranfenicol, tetraciclina y neomicina.

Además se proporcionan en el presente documento composiciones que incluyen una partícula vírica descrita en el presente documento, o los tres segmentos genómicos descritos en el presente documento. Dichas composiciones normalmente incluyen un transportador farmacéuticamente aceptable. Como se usa en el presente documento, "transportador farmacéuticamente aceptable" incluye solución salina, disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes de la absorción e isotónicos y similares, compatibles con la administración farmacéutica. En las composiciones también pueden incorporarse compuestos activos adicionales.

Una composición descrita en el presente documento puede denominarse vacuna. El término "vacuna" como se usa en el presente documento se refiere a una composición que, tras la administración a un animal, aumentará la probabilidad de que el receptor monte una respuesta inmunitaria frente a un antígeno codificado por uno de los segmentos genómicos descritos en el presente documento.

Una composición puede prepararse por métodos bien conocidos en la técnica farmacéutica. En general, una

- composición se puede formular para que sea compatible con su vía de administración prevista. La administración puede ser sistémica o local. Los ejemplos de vías de administración incluyen la administración parenteral (por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular), entérica (por ejemplo, oral) y tópica (por ejemplo, la epicutánea, por inhalación, transmucosa). Las formas farmacéuticas apropiadas para la administración entérica del compuesto de la presente invención pueden incluir comprimidos, cápsulas o líquidos. Las formas farmacéuticas apropiadas para la administración parenteral pueden incluir la administración intravenosa. Las formas farmacéuticas apropiadas para la administración tópica pueden incluir pulverizadores nasales, inhaladores de dosis medida, inhaladores de polvo seco o por nebulización.
- Las soluciones o suspensiones pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril, tal como agua para administración, solución salina, aceites no volátiles, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos, tales como alcohol bencílico o metil parabenos; antioxidantes, tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes, tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones, tales como acetatos, citratos o fosfatos; electrolitos, como el ion de sodio, ion de cloruro, ion de potasio, ion de calcio e ion de magnesio, y agentes para el ajuste de la tonicidad, tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. Una composición se puede introducir en ampollas, jeringuillas desechables o viales multidosis fabricados de vidrio o plástico.
- Las composiciones pueden incluir soluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones estériles. Para la administración intravenosa, los transportadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, solución salina tamponada con fosfato (PBS) y similares. Normalmente, una composición esta estéril y, cuando sea adecuado para uso inyectable, debe ser fluida en la medida en que exista una fácil inyectabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y preservarse de la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El transportador puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. Puede lograrse la prevención de la acción de microorganismos mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferente incluir en la composición agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio. Puede lograrse la absorción prolongada de las composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.
- Las soluciones estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo (por ejemplo, una partícula vírica descrita en el presente documento) en la cantidad necesaria en un disolvente apropiado, con un ingrediente o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, seguido de esterilización por filtrado. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril, que contiene un medio de dispersión básico y cualquier otro ingrediente apropiado. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferentes de preparación incluyen secado al vacío y liofilización, los cuales producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado, a partir de una solución previamente esterilizada de los mismos.
- Las composiciones orales incluyen, generalmente, un diluyente inerte o un transportador comestible. Con el fin de una administración terapéutica oral, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos, trociscos o cápsulas, por ejemplo, cápsula de gelatina. Las composiciones orales también pueden prepararse usando un transportador fluido para su uso como enjuague bucal. Pueden incluirse como parte de la composición agentes aglutinantes y/o materiales adyuvantes farmacéuticamente compatibles. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante, tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente, tal como almidón o lactosa, un agente disgregante, tal como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante, tal como estearato de magnesio o Sterotes; un emoliente, tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante, tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante, tal como menta, salicilato de metilo o saborizante de naranja.
- Para la administración por inhalación, los compuestos activos se suministran en forma de una pulverización de aerosol a partir de un recipiente o dosificador a presión que contiene un propulsor adecuado, por ejemplo, un gas, tal como dióxido de carbono, o un nebulizador.
- La administración sistémica también puede ser por medios transmucosos o transdérmicos. Para administración transmucosa o transdérmica, se usan en la formulación agentes penetrantes apropiados para la barrera que va a penetrarse. Dichos agentes penetrantes se conocen generalmente en la técnica e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosa, detergentes, sales biliares y derivados del ácido fusídico. La administración transmucosa puede lograrse a través del uso de pulverizaciones nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en pomadas, bálsamos, geles o cremas, tal como se conoce de manera general en la técnica.
- Los compuestos activos se pueden preparar con transportadores que protegerán al compuesto frente a una rápida eliminación del organismo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes. Pueden usarse

polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como acetato de etilvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Dichas formulaciones pueden prepararse usando técnicas convencionales. Como transportadores farmacéuticamente aceptables también pueden usarse suspensiones liposómicas. Estas pueden prepararse de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la materia.

Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y de estudios en animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificación para su uso en un animal. La dosificación de tales compuestos se encuentra preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluyen la DE₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población) con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma farmacéutica empleada y de la vía de administración utilizada.

Las composiciones se pueden administrar una vez para dar como resultado una respuesta inmunitaria, o una o más veces adicionales como refuerzo para potenciar la respuesta inmunitaria y aumentar la probabilidad de que la inmunidad frente al antígeno sea de larga duración. El experto en la materia apreciará que determinados factores pueden influir en la dosificación y el tiempo necesarios para tratar de forma eficaz a un sujeto, incluyendo, pero sin limitación, la gravedad de la enfermedad o trastorno, los tratamientos anteriores, el estado de salud general y/o la edad del sujeto, y otras enfermedades presentes.

También se proporcionan en el presente documento métodos para usar los segmentos genómicos. En una realización, un método incluye fabricar una partícula vírica infecciosa. Dicho método incluye, pero sin limitación, proporcionar una célula que incluya cada uno de los tres segmentos genómicos descritos en el presente documento (un primer segmento genómico, un segundo segmento genómico, y un tercer segmento genómico), e incubar la célula en condiciones adecuadas para generar moléculas de ARN genómico de longitud completa de cada segmento genómico. El ARN genómico de longitud completa de cada segmento genómico es antígeno. La producción de moléculas de ARN genómico de longitud completa de cada segmento genómico da como resultado la transcripción y traducción de cada producto génico vírico y la amplificación del genoma vírico para generar partículas de virus progenie infecciosas. Como se usa en el presente documento, una "partícula de virus infecciosa" se refiere a una partícula de virus que puede interactuar con una célula eucariota adecuada, tal como una célula de mamífero (por ejemplo, una célula murina o una célula humana) o una célula aviar, para dar como resultado la introducción de los tres segmentos genómicos en la célula y la transcripción de los tres segmentos genómicos en la célula. El método también puede incluir la introducción en la célula de los vectores que codifican los tres segmentos genómicos. Las partículas de virus infecciosas se liberan en los sobrenadantes y se pueden aislar y amplificar adicionalmente mediante el cultivo en células. El método puede incluir aislar una partícula vírica a partir de una célula o una mezcla de células y de restos celulares. El método puede incluir la inactivación de partículas de virus utilizando métodos convencionales, tal como un tratamiento con peróxido de hidrógeno. Además, se proporciona una partícula vírica, infecciosa o inactivada, que contiene tres segmentos genómicos descritos en el presente documento.

En una realización, un método incluye la expresión de un antígeno en una célula. Dicho método incluye, pero sin limitación, introducir en una célula los tres segmentos genómicos descritos en el presente documento. En una realización, la introducción es mediante la introducción de una partícula vírica que es infecciosa o esta inactivada. El segundo y/o el tercer segmento genómico pueden incluir una segunda región codificante que codifica un antígeno. El segundo y el tercer segmentos genómicos pueden codificar el mismo antígeno o pueden codificar antígenos distintos. Se puede administrar más de un tipo de partícula vírica. Por ejemplo, se pueden administrar dos poblaciones de partículas víricas, en que cada población codifica antígenos distintos. En esta realización, una única administración puede dar como resultado la expresión de múltiples antígenos en una célula. La célula es una célula eucariota adecuada, tal como una célula de mamífero (por ejemplo, una célula murina o una célula humana) o una célula aviar. En una realización, la célula aviar es un fibroblasto embrionario de pollo. La célula puede estar *ex vivo* o *in vivo*. Los tres segmentos genómicos se pueden introducir poniendo en contacto una célula con una partícula de virus infecciosa que contiene los tres segmentos genómicos, o introduciendo en la célula los vectores que incluyen los segmentos genómicos. El método incluye adicionalmente incubar la célula en condiciones adecuadas para la expresión de las regiones codificantes presentes en los tres segmentos genómicos, incluyendo la una o dos segundas regiones codificantes presentes en el segundo y/o tercer segmentos genómicos. Como se usa en el presente documento, "*ex vivo*" se refiere a una célula que se ha extraído del cuerpo de un animal. Las células *ex vivo* incluyen, por ejemplo, células primarias (por ejemplo, células que se han extraído recientemente de un sujeto y que son capaces de crecer de forma limitada en medio de cultivo de tejidos), y células cultivadas (por ejemplo, células que se pueden cultivar a largo plazo en medio de cultivo de tejidos). "*In vivo*" se refiere a células que están dentro del cuerpo de un sujeto.

En una realización, un método incluye inmunizar un animal. Dicho método incluye, pero sin limitación, administrar a un animal una partícula vírica que es infecciosa o está inactivada, que contiene los tres segmentos genómicos descritos en el presente documento. El segundo y/o el tercer segmento genómico pueden incluir una segunda región codificante que codifica un antígeno. El segundo y el tercer segmentos genómicos pueden codificar el mismo antígeno o pueden codificar antígenos distintos. Se puede administrar más de un tipo de partícula vírica. Por ejemplo, se pueden administrar dos poblaciones de partículas víricas, en que cada población codifica antígenos distintos. En esta realización, una única administración puede dar como resultado la vacunación de un animal frente a múltiples patógenos. El animal puede ser cualquier animal que necesite inmunización, incluyendo un vertebrado, tal como un mamífero o un ave. El animal puede ser, por ejemplo, en ave (incluyendo, por ejemplo, un pollo o pavo), un bovino

(incluyendo, por ejemplo, un miembro de la especie *Bos taurus*), un caprino (incluyendo, por ejemplo, una cabra), un ovino (incluyendo, por ejemplo, ovejas), un porcino (incluyendo, por ejemplo, cerdos), un bisonte (incluyendo, por ejemplo, un búfalo), un animal de compañía (incluyendo, por ejemplo, un gato, un perro y un caballo), miembros de la *Muridae* (incluyendo, por ejemplo, una rata o ratón), una cobaya o un ser humano. En una realización, el animal puede ser un animal en riesgo de exposición a una enfermedad infecciosa, tal como una enfermedad provocada por o asociada con un patógeno vírico, procariota o eucariota. En una realización, el animal puede ser un animal que necesita inmunización frente un antígeno asociado con una enfermedad no infecciosa, tal como el cáncer. Por ejemplo, el antígeno puede ser uno que ayude a un animal a montar una respuesta inmunitaria que tenga como objetivo y elimine células cancerosas. La respuesta inmunitaria puede ser una respuesta humoral (por ejemplo, la respuesta inmunitaria incluye la producción de anticuerpos en respuesta a un antígeno), una respuesta celular (por ejemplo, la activación de fagocitos, linfocitos T citotóxicos específicos para antígeno y la liberación de citocinas en respuesta a un antígeno), o una combinación de las mismas.

En otra realización, un método incluye tratar uno o más síntomas de determinadas afecciones en un animal. En una realización, una afección está provocada por una infección por un virus o un microbio. Como se usa en el presente documento, el término "infección" se refiere a la presencia y multiplicación de un virus o microbio en el cuerpo de un sujeto. La infección puede ser asintomática desde el punto de vista clínico o puede dar como resultado síntomas asociados con la enfermedad provocada por el virus o microbio. La infección puede estar en una fase temprana o en una fase tardía. En otra realización, una afección es provocada por una enfermedad, tal como el cáncer. Como se usa en el presente documento, el término "enfermedad" se refiere a cualquier desviación o interrupción de la estructura o función normal de una parte, órgano o sistema, o combinación de los mismos, de un sujeto, que se manifiesta por un síntoma característico o conjunto de síntomas. El método incluye administrar una cantidad eficaz de una composición descrita en el presente documento a un animal que tiene o está en riesgo de tener una afección o síntomas de una afección, y determinar si al menos un síntoma de la afección cambia, preferentemente, se reduce.

El tratamiento de los síntomas asociados con una afección puede ser profiláctico o, como alternativa, puede iniciarse después del desarrollo de la afección. Como se usa en el presente documento, el término "síntoma" se refiere a evidencia objetiva en un sujeto de una afección provocada por infección por una enfermedad. Los síntomas asociados con las afecciones a las que se hace referencia en el presente documento y las evaluaciones de tales síntomas son rutinarios y conocidos en la técnica. El tratamiento que es profiláctico, por ejemplo, que se inicia antes de que un sujeto manifieste síntomas de una afección, se denomina en el presente documento tratamiento de un sujeto que está "en riesgo" de desarrollar la afección. Por consiguiente, la administración de una composición se puede realizar antes, durante o después de la aparición de las afecciones descritas en el presente documento. El tratamiento iniciado después del desarrollo de una afección puede dar como resultado la disminución de la gravedad de los síntomas de una de las afecciones o eliminarlos por completo. En este aspecto de la invención, una "cantidad eficaz" es una cantidad eficaz para prevenir la manifestación de los síntomas de una afección, disminuir la gravedad de los síntomas de una afección y/o eliminar completamente los síntomas.

También se proporciona en el presente documento un kit para inmunizar un animal. El kit incluye partículas víricas como se describe en el presente documento, en que los segundo y/o tercer segmentos genómicos incluyen cada uno de forma independiente una región codificante que codifica un antígeno, en un material de envasado adecuado en una cantidad suficiente para al menos una inmunización. En una realización, el kit puede incluir más de un tipo de partícula vírica, por ejemplo, el kit puede incluir una partícula vírica que codifique uno o dos antígenos y una segunda partícula vírica que codifique uno o dos antígenos más. Opcionalmente, también se incluyen otros reactivos tales como tampones y soluciones necesarias para la práctica de la invención. Normalmente, también se incluyen instrucciones para el uso de las partículas víricas empaquetadas.

Como se usa en el presente documento, la frase "material de envasado" se refiere a una o más estructuras físicas utilizadas para alojar el contenido del kit. El material de envasado se construye por métodos conocidos, para proporcionar, preferentemente, un entorno estéril, sin contaminantes. El material de envasado tiene una etiqueta que indica que las partículas víricas pueden usarse para inmunizar a un animal. Además, el material de envasado contiene instrucciones que indican cómo se emplean los materiales dentro del kit para inmunizar a un animal. Como se usa en el presente documento, el término "envase" se refiere a una matriz o material sólido tal como vidrio, plástico, papel, papel de aluminio, y similares, capaz de contener partículas víricas dentro de límites fijos. Por lo tanto, por ejemplo, un envase puede ser un vial de vidrio utilizado para contener una cantidad apropiada de partículas víricas. Las "instrucciones de uso" generalmente incluyen una expresión tangible que describe la cantidad de partículas víricas, la vía de administración y similares.

El término "y/o" significa uno o todos los elementos enumerados o una combinación de dos o más de los elementos enumerados.

Las palabras "preferente" y "preferentemente" se refieren a realizaciones de la invención que pueden permitir determinados beneficios, en determinadas circunstancias. Sin embargo, también pueden ser preferentes otras realizaciones, en las mismas circunstancias u otras. Adicionalmente, la mención de una o más realizaciones preferentes no implica que otras realizaciones no sean útiles y no pretende excluir otras realizaciones del alcance de la invención.

El término "comprende" y variaciones del mismo no tienen un significado limitante cuando estos términos aparecen en la descripción y en las reivindicaciones.

5 A menos que se especifique otra cosa, "un", "uno/a", "el/la/los/las", y "al menos uno/una" se usan indistintamente y significan uno o más de uno.

Además, en el presente documento, las menciones de intervalos numéricos por valores extremos incluyen todos los números incluidos dentro de ese intervalo (por ejemplo, 1 a 5 incluye 1, 1,5, 2, 2,75, 3, 3,80, 4, 5, etc.).

10 Para cualquier método divulgado en el presente documento que incluya etapas diferenciadas, estas pueden realizarse en cualquier orden factible. Y, según sea apropiado, puede realizarse simultáneamente cualquier combinación de dos o más etapas.

15 El sumario anterior de la presente invención no pretende describir cada realización divulgada o cada implementación de la presente invención. La siguiente descripción ejemplifica más particularmente realizaciones ilustrativas. En varios lugares a lo largo de la solicitud, se proporciona orientación a través de listados de ejemplos, los cuales pueden usarse en diversas combinaciones. En cada caso, el listado enumerado sirve solamente como grupo representativo y no debe interpretarse como un listado exclusivo.

20 La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

25 Un vector de vacuna basado en arnavirus que porta antígenos del virus de la gripe confiere protección a largo plazo en ratones frente a la exposición letal con el virus de la gripe

El virus Pichindé (VPIC) es un arnavirus no patógeno que se ha utilizado como virus modelo para estudiar la infección con fiebre hemorrágica vírica. Con anterioridad se desarrolló un sistema de genética inversa para generar virus VPIC infecciosos a partir de dos plásmidos que codifican los segmentos de ARN vírico grande (L, *large*) y pequeño (S, *small*) (Lan *et al.*, 2009, J Virol 83:6357-6362). En el estudio actual, se creó un sistema de genética inversa de segunda generación para producir virus VPIC infecciosos recombinantes a partir de 3 plásmidos distintos, que se denomina sistema de VPIC trisegmentado. Estos virus recombinantes portan 3 segmentos de ARN genómico vírico que codifican para todos los productos génicos víricos, así como para dos genes extraños. Este sistema de VPIC trisegmentado se puede utilizar como un nuevo vector de vacuna para suministrar la hemaglutinación (HA) y la nucleoproteína (NP) de la cepa del virus de la gripe A/PR8. Los ratones inmunizados con estos virus recombinantes están protegidos frente a la exposición letal con el virus de la gripe, como lo demuestra la supervivencia de los animales gracias a los altos niveles de anticuerpos neutralizantes para la HA y las respuestas de linfocitos T citotóxicos (CTL) específicas para NP frente a la infección vírica. Estos virus VPIC recombinantes trisegmentados no inducen una fuerte inmunidad anti vector del VPIC, convirtiéndolos, así, en candidatos ideales en una estrategia de vacunación de sensibilización-refuerzo a fin de inducir inmunidad de reacción cruzada. En resumen, se ha desarrollado un nuevo vector de vacuna con microbios vivos que puede expresar múltiples antígenos extraños para inducir una fuerte inmunidad humoral y mediada por células y poca inmunidad antivector *in vivo*.

45 Introducción

Los inventores han desarrollado el único sistema de genética inversa disponible para generar virus VPIC infecciosos a partir de la transfección de plásmidos en células de mamífero apropiadas (Lan *et al.*, 2009, J Virol 83:6357-6362). Este sistema consiste en 2 plásmidos, para generar ARN genómicos de L y S de longitud completa a partir de señales reguladoras (promotoras/terminadoras) diseñadas técnicamente del bacteriófago T7 y de la secuencia de la ribozima de la hepatitis delta ubicada cadena arriba y cadena abajo de las secuencias genómicas del VPIC, respectivamente. Cuando se transfectan en células epiteliales de riñón de hámster lactante que expresan constitutivamente la ARN polimerasa del bacteriófago T7 (BSRT7-5, anteriormente conocida como BHK-T7), se generan los segmentos de ARN de L y S del VPIC, a partir de los cuales todos los productos génicos víricos del VPIC, incluyendo la polimerasa L y la nucleoproteína NP, se transcriben y traducen a fin de amplificar el genoma vírico y generar partículas progenie de virus infeccioso. Los virus VPIC infecciosos se liberan en los sobrenadantes y se aíslan y amplifican adicionalmente mediante el cultivo en células epiteliales de mono verde africano (Vero).

60 Como se describe en el presente documento, se ha desarrollado un sistema de genética inversa de segunda generación para producir virus VPIC infecciosos recombinantes a partir de 3 plásmidos distintos, que se denomina sistema de VPIC trisegmentado. Estos virus recombinantes portan 3 segmentos de ARN genómico vírico que codifican para todos los productos génicos víricos, así como para dos genes extraños. Este sistema de VPIC trisegmentado se puede usar como un nuevo vector de vacuna para otros antígenos víricos, tales como los del virus de la gripe. Resumiendo brevemente, se han producido virus VPIC trisegmentados que expresan la hemaglutinación (HA) o la nucleoproteína (NP) de la cepa del virus de la gripe A/PR8, y estos vectores de vacuna de VPIC trisegmentado pueden inducir una fuerte inmunidad humoral y mediada por células, tal como una producción sólida de anticuerpos

neutralizantes específicos para el virus de la gripe y una fuerte respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos para el virus de la gripe en ratones vacunados, con poca inmunidad anti vector de VPIC, lo que los hace candidatos ideales para la estrategia de vacunación de sensibilización-refuerzo a fin de inducir una inmunidad de larga duración y de reacción cruzada. Por lo tanto, este novedoso sistema de vector de vacuna basado en VPIC descrito en el presente documento que han desarrollado los inventores satisface todos los criterios necesarios para un vector vírico ideal, tal como la seguridad, la inducción de respuestas inmunitarias celulares y humorales fuertes y duraderas, sin inmunidad preexistente y la falta de inmunidad anti vector.

Materiales y métodos

Construcción de plásmidos que codifican los segmentos de ARN de P18 S del virus de Pichindé diseñados técnicamente con sitios de clonación múltiple (MCS, forma sigla de *multiple-cloning-sites*) que reemplazan el gen GPC o NP.

Se desarrolló con anterioridad un sistema de genética inversa para el VPIC mediante la transfección de 2 plásmidos que codificaban los segmentos de ARN L y S en sentido antígenómico (ag), en células BHK-T7 (Fig. 1) (Lan *et al.*, 2009, J Virol 83:6357-6362). Se usó el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) solapante para reemplazar el marco de lectura abierta (ORF, forma siglada de *open-reading-frame*) del gen de la glucoproteína vírica (GPC) o de la nucleoproteína (NP) con sitios de clonación múltiple (MCS) en el plásmido que codifica el ARN_{ag} de S. Los plásmidos resultantes (Fig. 2A), P18S-GPC/MCS y P18S-MCS/NP, contienen el MCS con las secuencias para enzimas de restricción (Nhe I-Mfe I-Acc65I-Kpn I-EcoR V-Xho I-Sph I), que se introduce en estos plásmidos para clonar genes extraños con comodidad (por ejemplo, genes indicadores y/o antígenos víricos).

Subclonación del gen indicador GFP, del gen de la HA o de la NP del virus de la gripe en el vector P18S-GPC/MCS. Se usó PCR para subclonar el gen indicador de la proteína fluorescente verde (GFP) y el gen de la HA o la NP del virus de la gripe de la cepa A/PR8 (H1N1) en el vector P18S-GFP/MCS, entre los sitios Nhe I y Xho I, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de la hemaglutinina de A/PR8 se puede encontrar en Genbank con el número de referencia NC_002017.1, y la secuencia de aminoácidos de la nucleoproteína de A/PR8 se puede encontrar en Genbank con el número de referencia NC_002019.1. Las construcciones de plásmidos recombinantes se confirmaron mediante secuenciación de ADN. Los plásmidos resultantes (Fig. 5) se llaman P18S-GPC/GFP, P18S-GPC/H1 y P18S-GPC/NP, respectivamente.

Recuperación de virus Pichindé trisegmentados recombinantes que expresan GFP, HA o NP del virus de la gripe.

Los virus recombinantes se recuperaron a partir de los plásmidos mediante la transfección de BSRT7-5 (también conocida como BHK-T7) con 3 plásmidos que expresan el segmento de ARN_{ag} de L de P18 de longitud completa, un segmento de S de P18 con MCS en lugar de GPC (P18S-MCS/NP) y un segmento de S de P18 con el gen de la GFP, la HA o la NP en lugar de NP (P18S-GPC/GFP, P18S-GPC/N1 o P18S-GPC/NP) (Fig. 2B y Fig. 5). Los procedimientos para generar los VPIC recombinante son esencialmente los mismos que los descritos anteriormente (Fig. 1B) (Lan *et al.*, 2009, J Virol 83:6357-6362). Brevemente, se cultivaron células BHK-T7 hasta un 80 % de confluencia y 4 horas antes de la transfección, las células se lavaron y se incubaron con medios sin antibióticos. Para la transfección, se diluyeron 2 µg de cada plásmido en 250 µl de Opti-MEM y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadió un volumen equivalente de Opti-MEM con 10 µl de lipofectamina (Invitrogen, Life Technologies) y la mezcla se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, las células se transfectaron con los plásmidos y los medios se reemplazaron nuevamente después de 4 horas, para eliminar la lipofectamina. Después de 48 horas de transfección, se recogieron los sobrenadantes celulares para un ensayo de placas. El virus cultivado a partir de placas individuales se usó para preparar reservas que se cultivaron en células BHK-21 y se almacenaron a -80 °C.

Detección de la expresión de antígenos del virus de la gripe en células infectadas con vectores de VPIC trisegmentado recombinantes.

Se infectaron células BHK-21 cultivadas en cubreobjetos con el virus Pichindé (VPIC) de tipo silvestre o con los virus VPIC recombinantes que expresaban el gen HA (rVPIC-HA) o NP (rVPIC-NP) del virus de la gripe. Después de 24 horas de infección con el virus, las células se fijaron con paraformaldehído al 4 % durante 15 minutos a temperatura ambiente, seguido de 3 lavados con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Las células se incubaron en Triton X-100 0,1 % durante 12 minutos, seguido de 1 hora de incubación con un anticuerpo primario (ratón anti NP de virus de la gripe A). Después, las células se lavaron y se incubaron con un anticuerpo secundario (anti ratón alexa flour-647) durante 1 hora a temperatura ambiente.

Inmunización y exposición de ratones.

Se obtuvieron ratones C57BL/6 hembra de seis a ocho semanas de edad de Charles River Laboratories y se alojaron durante al menos 1 semana para su aclimatación. Los ratones se alojaron en jaulas microaislantes en un animalario equipado con NBS-2. Los ratones se inyectaron con 100.000 ufp de virus rVPIC en 100 µl de volumen total, por vía intraperitoneal. Después de 14 días del último refuerzo, los ratones se expusieron por vía intranasal a 10 DL₅₀

(10.000 ufp) de la cepa A/PR8 del virus de la gripe adaptada a ratón.

Análisis de la CTL específica para virus mediante tinción de tetrámero.

5 Se obtuvieron esplenocitos individuales y se lisaron los glóbulos rojos (GR) utilizando tampón de lisis ACK. Después, los esplenocitos se lavaron dos veces con tampón FACS (PBS+FBS al 2 %). Las células (1×10^5) se tiñeron con CD8-PerCP-Cy5.5, CD3-APC y tetrámero H-2Db-PE, con el epítipo de NP₃₆₆₋₃₇₄ ASNENMETM (SEQ ID NO: 7) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de la incubación, las células se lavaron tres veces con tampón FACS y las células marcadas se analizaron por citometría de flujo. Los datos de FACS se analizaron utilizando el programa informático FloJo.

Ensayo de inhibición de la hemaglutinación.

15 Se extrajo sangre después de 14 días de cada inmunización y se recogió suero. Los inhibidores inespecíficos se eliminaron del suero mediante un tratamiento de una noche con 5 volúmenes de enzima destructora de receptores (Sigma), seguido de 45 min de incubación a 56 °C, para inactivar la enzima y el suero. Después, cada muestra de suero se diluyó de forma seriada en 25 ul de PBS, y después se mezcló con un volumen equivalente de PBS que contenía 4 unidades de HA de A/PR8. Después de 15 min de incubación a temperatura ambiente, se añadieron 50 ul de GR de pavo al 0,5 % y la mezcla se incubó durante 1 hora a 4 °C antes de la evaluación de la aglutinación. El título se registró como la inversa de la última dilución que inhibió la aglutinación.

Determinación de títulos de virus en los pulmones.

25 Para evaluar la replicación del virus de la gripe A/PR8 en ratones, se recogieron pulmones el día 6 del posexposición, se pesaron y se homogeneizaron en medio L15. El homogeneizado de tejido se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos, y el virus se tituló en una placa de 12 pocillos, en monocapas de células de riñón canino Madin-Darby (MDCK).

Resultados

30 1. Generación del virus Pichindé trisegmentado recombinante que expresa el gen indicador GFP.

El grupo de la Torre informó por primera vez un sistema de arnavirus trisegmentado para VCML (Emonet *et al.*, 2009, Proc Natl Acad Sci U S A 106:3473-3478), que ha generado VCML recombinante infeccioso que empaqueta 3 segmentos de ARN, un segmento L de longitud completa y dos segmentos S con delección en GPC o NP. Anteriormente, los inventores han desarrollado un sistema de genética inversa para el virus Pichindé (VPIC) (Lan *et al.*, 2009, J Virol 83:6357-6362), que es un arnavirus prototípico que no es patógeno en humanos. Este sistema consiste en 2 plásmidos que expresan los segmentos L y S del VPIC cuando se transfectan en las células BSRT7-5 (también conocidas como BHKT7) (Fig. 1).

40 En el estudio actual, se ha generado una segunda generación del sistema genético inverso de VPIC que consiste en 3 plásmidos que producen dos segmentos distintos de ARN de S, uno que porta una delección en GPC y el otro segmento S contiene una delección del gen NP (Fig. 2). En lugar de los genes víricos delecionados, los inventores han insertado sitios de clonación múltiple (MCS) (Fig. 2A). Después, los inventores subclonaron el gen indicador GFP en el segmento S2 de P18 en la posición de la GPC eliminada, usando los sitios Nhe I/Kpn I dentro del MCS, y generaron virus infecciosos a partir de sobrenadantes de células BSRT7-5 transfectadas con tres plásmidos, uno que codifica los genes víricos Z y L en el segmento de L de P18 de longitud completa, y los otros dos plásmidos de S1 y S2 (es decir, P18 S1-MCS y P18 S2-GFP), que expresan el gen vírico GPC solo o ambos genes NP e informador GFP (Fig. 2B). Se prepararon virus de reserva a partir de virus purificados por placa. Todas las placas lucieron verdes al microscopio de fluorescencia, demostrando la recuperación satisfactoria del virus rP18tri-GFP. Además de las células Vero (datos no mostrados), La infección con el virus rP18tri-GFP expresó la GFP en otras células permisivas tales como BHK-21 y A549 (Fig. 3), y liberó más virus progenie infecciosos que expresó GFP tras la infección de un cultivo reciente de células diana BHK-21 (Fig. 3), lo que demuestra la estabilidad e integridad del virus rP18tri-GFP en cultivos celulares. Los estudios de curso temporal demostraron que la GFP se expresó fuertemente después de 12 h posinfección y que el ciclo de vida completo de rP18tri-GFP fue de aproximadamente 16 h ya que la concentración del virus rP18tri-GFP en los sobrenadantes aumentó bruscamente a ~ 16 hpi (Fig. 4). En un experimento preliminar se descubrió que el vector del virus VPIC-tri-GFP puede infectar fibroblastos embrionarios de pollo (línea celular CEF) en cultivo celular (datos no mostrados).

60 Los crecimientos de virus de los VPIC bisegmentados y trisegmentados se compararon realizando el análisis de la curva de crecimiento de rP2, rP18 y rP18tri-GFP en células BHK-21 en la multiplicidad de infección (moi) de 0,01. Como cabía esperar, el virus rP18 virulento conocido creció ligeramente más rápido y mejor que rP2 en ~ 0,5 log el título del virus. El virus rP18tri-GFP trisegmentado creció con una cinética similar a la de los virus rP2 y rP18, aunque con títulos disminuidos ~ 1 a 1,5 log (Fig. 4). En resumen, el virus VPIC trisegmentado parece retrasado en velocidad de crecimiento y títulos, en comparación con los virus VPIC rP2 y rP18 bisegmentados.

65 A fin de determinar la estabilidad del virus rP18tri-GFP, es decir, analizar si el cultivo *in vitro* del virus rP18tri-GFP

seleccionaba un retromutante de virus de tipo silvestre bisegmentado que hubiera perdido el gen GFP debido a recombinación genómica, el rP18tri-GFP se pasó en cultivos de células BHK-21 de forma continuada, y se realizó un ensayo de placas en diversos pases para examinar la expresión de GFP en cada una de las placas. En cualquiera de los pases analizados (hasta 23 pases), todas las placas aún expresaban niveles fuertes del gen indicador GFP, lo que sugiere que el gen informador GFP podría mantenerse de forma estable en las partículas víricas infecciosas incluso después de extensos pases en cultivo celular.

2. Generación del virus Pichindé trisegmentado recombinante que expresa antígenos del virus de la gripe.

Los genes de HA y NP de la cepa A/PR8/H1N1 del virus de la gripe se clonaron molecularmente en el MSC del plásmido P18 S2, respectivamente (Fig. 5). Los P18 S2-HA y P18 S2-NP resultantes se transfectaron por separado en células BHK-T7 junto con los P18L y P18S1-GFP de longitud completa, a fin de generar los virus rP18tri-GFP/HA y rP18tri-GFP/NP, respectivamente.

Todas las células infectadas (es decir, las placas) eran verdes al microscopio de fluorescencia, ya que los virus recombinantes transportaban el gen informador GFP en el segmento P18S2-GFP (Fig. 6). Además, Las expresiones de las proteínas HA y NP se detectaron mediante un ensayo de inmunofluorescencia usando anticuerpos específicos anti HA y anti NP en células Vero, a las 24 horas después de la infección (hpi) (Fig. 6). Considerados en su conjunto, hemos demostrado que, para expresar distintos genes extraños, pueden fabricarse virus trisegmentados, incluyendo el gen indicador GFP y dos antígenos del virus de la gripe distintos (HA y NP), durante la infección celular. 3. Las vacunas para la gripe basadas en rP18tri inducen inmunidad protectora en ratones.

El trabajo previo del laboratorio de los inventores demostró que la infección de ratones con VPIC, incluso a altas dosis a través de distintas vías, no provoca enfermedades ya que el VPIC se elimina 4 días posinfección (dpi) (datos no mostrados). En este caso, los inventores examinaron si los vectores de vacuna basados en rP18tri pueden inducir inmunidad protectora en ratones. Se infectaron ratones C57BL6 de forma simulada o se infectaron, por vía intranasal (i.n.), con una dosis baja (50 ufc) de A/PR8 o por vía i.p. con 1×10^5 ufp de rP18tri-GFP, rP18tri-GFP/HA y rP18tri-GFP/NP, respectivamente. Los ratones se reforzaron dos veces con el mismo virus a la misma dosificación en los días 14 y 28. Se recogieron muestras de sangre en distintos puntos temporales postsensibilización y postrefuerzo, para la determinación del título de anticuerpos neutralizantes. Los ratones se expusieron a los 14 d después del 2° refuerzo a una dosis letal conocida de A/PR8 (10xDLM50) y se controló el peso corporal y los síntomas de la enfermedad durante hasta 21 días. Todos los animales expuestos que previamente habían recibido vacunación con PBS o con rP18tri-GFP alcanzaron puntos terminales a los 7 dpi, mientras que todos los ratones vacunados con rP18tri-GFP/HA estaban completamente protegidos de la infección por el virus de la gripe letal. Dos de cada tres ratones vacunados con rP18tri-GFP/NP sobrevivieron (Fig. 7). Respecto a la vacunación con rP18tri-GFP/HA, los ratones expuestos mantuvieron el peso corporal, mientras que los dos sobrevivientes en el grupo de rP18tri-GFP/NP mostraron una ligera pérdida de peso corporal en la fase inicial pero se recuperaron rápidamente (datos no mostrados). De forma concordante con los datos de mortalidad, los ratones vacunados con HA o NP tuvieron cambios patológicos mínimos en los pulmones a los 3 dpi, en comparación con aquellos con PBS o vector solo. De manera similar, los títulos de virus en los pulmones a los 3 dpi también se correlacionaron con protección. El virus A/PR8 replicó a niveles altos en los pulmones de los ratones a los 3 dpi cuando los animales se vacunaron de forma simulada o con el vector rP18tri-GFP solo. Por el contrario, el título de virus no fue detectable en el grupo de vacunación de rP18tri-GFP/HA y se redujo significativamente en el grupo rP18tri-GFP/NP.

Considerados en su conjunto, estos resultados sugieren que el vector de vacuna basado en rP18tri puede inducir inmunidad protectora frente a la infección letal por el virus de la gripe en ratones. De acuerdo con estudios previos de vacunas para la gripe, la vacunación con HA puede inducir una protección completa frente a la enfermedad inducida por el virus de la gripe, mientras que la vacunación con NP habitualmente conduce a una protección parcial al reducir la gravedad de la enfermedad y controlar la replicación del virus *in vivo*.

4. La vacuna rP18tri-GFP/HA induce altos títulos de anticuerpos neutralizantes en ratones.

Se midieron los títulos de inhibición de la hemaglutinación (IHA) en sangre periférica extraída de ratones vacunados en distintos puntos temporales: 14 días postsensibilización, 7 d y 14 d pos 1^{er} refuerzo, y 14 d pos 2° refuerzo (Fig. 8). Como cabía esperar, los títulos de IHA de los grupos de rP18tri-GFP y rP18tri-GFP/NP no superaron el nivel de fondo, debido a que no se espera que la GFP ni la NP induzcan anticuerpos neutralizantes específicos para HA. Por el contrario, los títulos de IHA del grupo de vacunación con rP18tri-GFP/HA alcanzaron el nivel de 40 a los 14 d postsensibilización y aumentaron sustancialmente después del refuerzo (Fig. 8), lo que sugiere que la vacuna de rP18tri-GFP/HA puede inducir altos niveles de títulos de anticuerpos neutralizantes *in vivo*. Generalmente, se usa como medida de éxito un título de IAH umbral ≥ 40 , es decir, para proporcionar una reducción del 50 % del riesgo de influenza (título seroprotector) (Reber *et al.*, 2013, Expert Rev Vaccines 12:519-536), los datos de IHA sugieren que una dosis única de rP18tri-GFP/HA puede ser suficiente para conferir protección.

Se compararon los títulos de IHA generados por distintas vías de vacunación (Fig. 9). Los ratones se vacunaron con rP18tri-GFP/HA mediante una sensibilización y un refuerzo por vía intraperitoneal (i.p.), intramuscular (i.m.) o intranasal (i.n.). Las tres vías de inmunización suscitaron niveles significativos de respuesta humoral, como lo

demuestran los títulos de IHA en general relativamente altos. Sin embargo, parece que los títulos de IHA en los sueros con las vías de inyección i.m. e i.p. fueron relativamente más altos que los del grupo con la i.n. De todas formas, estos títulos de IHA fueron lo suficientemente altos como para conferir protección frente a una exposición letal con el virus de la gripe PR8. Como se muestra en la Fig. 10, no se observó una pérdida de peso significativa en los animales vacunados.

5. La vacuna de rP18tri-GFP/NP induce fuertes respuestas CTL en ratones.

La NP es una proteína vírica intracelular que se sabe que induce una respuesta de linfocitos T CD8⁺ contra ella. Se examinó si la vacuna de rP18tri-GFP/NP podía inducir respuestas CTL mediante un análisis de tetrámero específico de NP de células esplénicas y CMSP (células madre de sangre periférica) en distintos puntos temporales después de la sensibilización y el refuerzo con rP18tri-GFP/NP por vía intraperitoneal. Como se muestra en la Fig. 11 (parte superior), se detectaron linfocitos T CD8⁺ y CD44⁺ específicos para la NP en el grupo vacunado con rP18tri-GFP/NP, incluso a los 7 d postsensibilización, en un nivel comparable (si no mayor) a una dosis baja de infección con PR8, que aumentó aún más a los 7 d posrefuerzo, y todavía estaban presentes a los 14 d posrefuerzo (Fig. 11, centro). Además, los inventores exploraron el efecto de distintas vías de inoculación sobre las respuestas CTL. Como se muestra en la Fig. 12, tanto la vía de inoculación i.m. como la i.p. indujeron respuestas CTL más fuertes que la vía de infección i.n. En conjunto, los datos de los inventores demuestran que el vector basado en rP18tri puede inducir respuestas CTL fuertes *in vivo* y que las vías intramuscular e intraperitoneal son mejores que la vía intranasal para inducir respuestas CTL fuertes. Dado que la vía i.m. suscitó respuestas humorales y de linfocitos T óptimas, los experimentos posteriores se realizaron siguiendo la vía de inmunización i.m.

6. ¿Puede la vacuna basada en rP18tri desencadenar una inmunidad de larga duración?

Se evaluó el potencial del vector de vacuna rP18tri-GFP/HA para inducir una inmunidad de larga duración. Se inmunizaron dos veces ratones C57BL6 con un intervalo de 4 semanas y se expusieron 4 u 8 semanas después de la segunda inmunización a una dosis letal de virus A/PR/8 (H1N1). Las muestras de suero analizadas en cuanto a títulos de IHA en los días 14 y 30 postsensibilización y los días 30 y 60 postrefuerzo, demostraron un fuerte título de anticuerpos neutralizantes (Fig. 13A). El virus A/PR/8 de desafío replicó bien en los pulmones de los ratones vacunados de forma simulada, mientras que no hubo un título de virus detectable en los pulmones de los ratones vacunados que se sometieron a exposición 4 semanas después de la vacunación. Sin embargo, hubo títulos víricos significativamente menores en los pulmones de ratones inmunizados que se sometieron a exposición después de 8 semanas de vacunación (Fig. 13B). Como se muestra en la Fig. 13C, se observó protección completa ya que no hubo una pérdida de peso significativa en los ratones inmunizados con rP18tri-GFP/HA expuestos después de 4 semanas u 8 semanas de vacunación. Consistentemente, no hubo cambios patológicos significativos en los pulmones de los ratones inmunizados (Fig. 13D). En general, los niveles de inmunidad y protección fueron comparables con los observados a las 2 semanas después de la inmunización. La inmunización única con rP18tri-GFP/HA indujo protección frente a la exposición a H1N1 letal

Se inmunizaron ratones C57BL6 con rP18triGFP-HA por vía intramuscular. De manera destacable, una dosis única de rP18tri-GFP/HA indujo una protección completa frente a la infección letal con el virus A/PR/8 (H1N1) adaptado a ratón. Como se muestra en la Fig. 14B, después de la exposición los ratones de control vacunados con rP18tri-GFP continuaron perdiendo peso hasta que se precisó someterlos a eutanasia. Los resultados también demostraron que una única inmunización con una dosis mínima de 10³ ufp del vector rP18tri-GFP/HA suscitó una respuesta de Ac sólida inhibidora de la hemaglutinación (IH) y fue suficiente para conferir protección (Fig. 14A). Los análisis histológicos del corte del pulmón realizados 5-6 días después de la exposición revelaron una reducción significativa de la inflamación en ratones vacunados con rP18tri-GFP/HA, mientras que los ratones vacunados con rP18tri-GFP mostraron una infiltración masiva de células inflamatorias en el pulmón, congestión pulmonar y edema intralveolar (Fig. 14C).

Generación y caracterización de virus basados en rP18tri que expresan antígenos de proteínas víricas dobles del virus de la gripe

Para obtener el vector basado en rP18tri que expresa HA y NP o HA1 y HA3 del virus de la gripe, se insertó por lo tanto el ADN que codifica los genes respectivos del virus de la gripe en los vectores plasmídicos P18S-GPC/MCS y P18S-MCS/NP. Se clonaron HA1, NP y HA3 amplificados por RT-PCR y se comprobó la secuencia de cada clon. Los plásmidos resultantes se denominaron P18S-GPC/HA1, P18S-NP1/NP y P18S-HA3/NP. El virus recombinante que expresa antígenos dobles (HA1 y NP1 del virus de la gripe) se rescató después por cotransfección de 3 plásmidos que expresan el segmento de ARN_g de L de P18 de longitud completa, P18S-GPC/HA1 y P18S-NP1/NP. De forma simultánea, también se generó un virus recombinante similar de 3 segmentos con genes del virus de la gripe intercambiados mediante la cotransfección el segmento de ARN_g de L de P18 de longitud completa, P18S-GPC/NP1 y P18S-HA1/NP. De manera similar, el virus recombinante que expresa antígenos dobles (HA1 y HA3 del virus de la gripe) se rescató por cotransfección de 3 plásmidos que expresan el segmento de ARN_g de L de P18 de longitud completa, P18S-GPC/HA1 y P18S-HA3/NP.

Curiosamente, rP18tri-HA/NP tuvo títulos más bajos que rP18tri-NP/HA y formaba placas más pequeñas en células Vero (Fig. 15A). Sin embargo, el nivel de expresión de antígenos de proteínas víricas del virus de la gripe fue mayor

con rP18tri-HA/NP en comparación con rP18tri-NP/HA (Fig. 15B).

El vector basado en rP18tri que codifica múltiples antígenos de proteínas víricas del virus de la gripe (HA y NP) indujo respuestas tanto humorales como de linfocitos T en los ratones inmunizados.

El vector basado en rP18tri que codifica las HA y NP del virus de la gripe indujo de forma satisfactoria potentes respuestas humorales y de linfocitos T en los ratones que se inmunizaron con 10^4 ufp/ml del vector rP18tri-HA/NP o rP18tri-NP/HA. Se usaron la sangre periférica y el bazo de los ratones para controlar los niveles de respuestas de linfocitos T frente al epítipo inmunodominante NP₃₃₆, usando un tetrámero de MHC de clase I. Se detectaron linfocitos T CD8+ anti NP específicos en la sangre periférica y los esplenocitos de los ratones inmunizados. El día 7 posinmunización, los ratones tenían un porcentaje significativamente mayor de linfocitos T específicos para NP (Fig. 16A). Los linfocitos T CD8+ positivos para tetrámero alcanzaron un máximo 7 días después del refuerzo y se mantuvieron en un nivel de reposo hasta 14 días postrefuerzo (Fig. 16B). Los dos candidatos a vacuna también suscitaron una fuerte respuesta humoral, que se evaluó mediante el título de inhibición de la hemaglutinación en sueros recogidos a los 14 días postsensibilización y a los 14 días postrefuerzo. Los títulos de IH aumentaron después del refuerzo en ratones inmunizados con rP18tri-HA/NP, mientras que no se observó tal aumento en los ratones inmunizados con rP18tri-NP/HA (Fig. 16C).

En conjunto, la vacuna de rtriP18-HA/NP suscitó una respuesta inmunitaria más fuerte en comparación con la vacuna de rP18tri-NP/HA. Los mejores niveles de respuesta inmunitaria de rP18tri-HA/NP podrían atribuirse a un mayor nivel de expresión de los antígenos del virus de la gripe (Fig. 15B). No obstante, las vacunas de vectores rP18tri-HA/NP y rP18tri-NP/HA confieren protección completa frente a una exposición letal con el virus de la gripe A/PR/8. No se observaron síntomas de la enfermedad en los ratones inmunizados. Como se muestra en la Fig. 17A, no se pudieron detectar cambios histológicos significativos en los pulmones de los ratones inmunizados con ninguno de los candidatos a vacuna. Por el contrario, se observó infiltración de células inflamatorias en los pulmones de los ratones vacunados con rP18tri-GFP. Los días 3 y 6 posinfección se analizaron los títulos víricos en los pulmones para determinar la replicación del virus de exposición. Los ratones vacunados de forma simulada mostraron altos títulos víricos, mientras que los ratones vacunados con rP18tri-HA/NP y rP18tri-NP/HA no mostraron títulos detectables en el día 6 y uno de cada tres ratones en cada grupo mostró títulos de 3×10^3 ufp/ml y 5×10^3 ufp/ml, respectivamente, en el día 3 después de la infección (Fig. 17B). Los ratones vacunados con cualquiera de los candidatos a vacuna no mostraron pérdida de peso (Fig. 17C).

El vector basado en rP18tri que codifica múltiples antígenos de virus de la gripe (HA1 y HA3) indujo protección frente a exposiciones dobles

Se inmunizaron distintos grupos de ratones C57BL6 hembra con dos dosis de la vacuna de vector basada en rtriP18 que codifica solo HA del virus del subtipo H1 (rP18tri-HA1) o HA del subtipo H3 (rP18tri-HA3), o ambas, HA del subtipo H1 y el subtipo H3 (rP18tri-HA1/HA3). Los resultados indicaron que la primera dosis del vector basado en rtriP18 que codifica HA1 y HA3 indujo respuestas de anticuerpos frente a ambos antígenos víricos del virus de la gripe codificados, como lo revelan los sólidos títulos de IH para PR8 y X31. La segunda dosis de la vacuna aumentó aún más la respuesta de anticuerpos. Curiosamente, los títulos de IH inducidos por PR8 (H1) y X31 (H3) por rP18tri que codifica tanto HA1 como HA3 fueron comparables a los inducidos por el vector basado en rtriP18 que codifica solo HA1 o HA3 (Fig. 18A). Se obtuvieron resultados similares en ratones Balb/c (Fig. 18B). Al exponerlos a una dosis letal del virus PR8 (H1N1) o X31 (H3N2), los ratones inmunizados con el vector basado en rP18tri que codifica tanto HA1 como HA3 (rP18tri-HA1/HA3) estaban protegidos frente a ambos desafíos víricos. El día 5 después de la exposición al virus se evaluó la eficacia protectora de rP18tri-HA1/HA3 para prevenir la replicación de los virus de exposición. Los virus de exposición PR8 (H1N1) y X31 (H3N2) replicaron bien en los pulmones de los ratones vacunados de forma simulada, con unos títulos medios de 10^5 y 10^4 ufp/ml, respectivamente. La inmunización con rP18tri-HA1/HA3 protegió a los ratones frente a ambas exposiciones víricas, ya que no hubo pérdida de peso corporal y ninguno de los ratones inmunizados tenía títulos víricos detectables en los pulmones (Fig. 19A y B).

Las vacunas para la gripe basadas en rP18tri no inducen inmunidad anti vector.

Una debilidad percibida del vector vírico vivo es la inmunidad anti vector, lo que afecta a las respuestas inmunitarias inducidas por el mismo vector y excluye su uso en una estrategia de vacunación de sensibilización-refuerzo. El VPIC tiene poca o ninguna inmunidad preexistente en la población general (Trapido *et al.*, 1971, Am J Trop Med Hyg 20:631-641). Los inventores determinaron el efecto de la inmunidad anti vector contra el vector de VPIC midiendo los niveles de respuestas de anticuerpos y CTL mediante sensibilización-refuerzo con el mismo vector. Sorprendentemente, los inventores no encontraron evidencia de inmunidad anti vector contra el vector rVPICtri. Como se muestra en la Fig. 8, el refuerzo con el mismo vector aumentó sustancialmente aún más los títulos de IHA, lo que sugiere que las respuestas humorales específicas para HA aumentaron después del 2º e incluso después del 3º refuerzo. Se observó un hallazgo similar para las respuestas CTL. Después del refuerzo, los linfocitos T CD8 y CD44 específicos para NP en el bazo y en las CMSP, aumentaron (Fig. 20). Considerados en su conjunto, los datos de los inventores sugieren que el vector rVPIC no induce una fuerte inmunidad anti vector y, por lo tanto, puede usarse repetidamente en la estrategia de vacuna de sensibilización-refuerzo.

Sumario

Se ha desarrollado un nuevo sistema de genética inversa de VPIC para generar virus VPIC recombinantes trisegmentados que pueden codificar hasta dos genes extraños de interés. Estos virus recombinantes basados en rP18tri pueden expresar en las células diana los genes de HA y/o NP del virus de la gripe, junto con el gen informador GFP. Cuando se prueba en ratones, el virus rP18tri-GFP/HA puede inducir altos niveles de anticuerpos neutralizantes específicos de HA, mientras que el virus rP18tri-GFP/NP puede inducir fuertes respuestas CTL específicas de NP. Además, el vector basado en rP18tri que expresa antígenos víricos dobles del virus de la gripe, HA y NP, indujo de forma satisfactoria respuestas humorales y de linfocitos T que confieren protección completa frente a una exposición letal con el A/PR8 en ratones inmunizados. Más importante aún, el vector basado en triP18 que expresa HA de dos subtipos distintos del virus de la gripe, es decir, PR8 (H1N1) y X31 (H3N2), confiere protección frente a las dos exposiciones víricas, lo que demuestra la habilidad y versatilidad de estos nuevos vectores de vacuna frente a virus de la gripe patógeno. Además, es importante tener en cuenta que no existe inmunidad preexistente frente al vector de VPIC y que los animales inmunizados con los virus VPIC trisegmentados generan poca inmunidad anti vector de VPIC, haciendo de esta una plataforma de vacuna de vector ideal para inducir una inmunidad potente, de larga duración y de reacción cruzada tras la vacunación repetida en el caso que se necesite una estrategia de vacunación de sensibilización-refuerzo.

Ejemplo 2

Papel biológico de la exorribonucleasa NP en la infección por arnavirus *in vitro* e *in vivo*

La actividad ARNasa de los arnavirus es importante para la supresión de interferón tipo I (IFN), pero su papel (o papeles) biológicos no se han caracterizado bien. Los virus Pichindé recombinantes con mutaciones catalíticas de la ARNasa indujeron altos niveles de IFN y crecieron mal en células competentes para IFN, y, cuando infectan cobayas, estimularon fuertes respuestas de IFN, fracasaron en replicar productivamente y generaron retromutantes de tipo silvestre. Por lo tanto, la actividad de ARNasa de la NP es esencial para la supresión del IFN y para establecer una replicación productiva de forma temprana en la infección por arnavirus.

Los arnavirus incluyen varios agentes que provocan fiebre hemorrágica (FH) (por ejemplo, virus de Lassa - VLAS), y hay limitadas medidas preventivas o terapéuticas (McLay *et al.*, 2013, Antiviral Res 97:81-92, McLay *et al.*, 2014, J Gen Virol 95:1-15). La patogenia de los arnavirus se asocia con alta viremia y una supresión inmunitaria generalizada, cuyo mecanismo es poco conocido. Se ha demostrado que la NP vírica puede mediar de forma eficaz la supresión del IFN de Tipo I a través de su función de exorribonucleasa (ARNasa) (Jiang *et al.*, 2013, J Biol Chem 288:16949-16959, Martínez-Sobrido *et al.*, 2007, J Virol 81:12696-12703, Martínez-Sobrido *et al.*, 2006, J Virol 80:9192-9199, Qi *et al.*, 2010, Nature 468:779-783, Hastie *et al.*, 2011, Proc Natl Acad Sci U S A 108:2396-2401, Hastie *et al.*, 2012, PLoS ONE 7:e44211). Sin embargo, el papel de la actividad ARNasa de la NP en la mediación de la supresión inmunitaria del hospedador *in vivo* no se ha caracterizado bien. En este estudio, se utilizó la infección por el virus Pichindé (VPIC) de cobayas como modelo sustituto de las fiebres hemorrágicas por arnavirus (FH) (Aronson *et al.*, 1994, Am J Pathol 145:228-235, Lan *et al.*, 2009, J Virol 83:6357-6362), para caracterizar el papel de la NP ARNasa en la infección vírica y las respuestas de IFN del hospedador. La sustitución de una única alanina en cada uno de los restos catalíticos de la ARNasa (D380A, E382A, D525A, H520A y D457A) pudo anular la capacidad de la NP de suprimir la activación de IFN β inducida por virus Sendai mediante un ensayo indicador de luciferasa (LUC) (Fig. 21A), corroborando las anteriores observaciones de los inventores con NP del VLAS (Qi *et al.*, 2010, Nature 468:779-783). Utilizando su sistema desarrollado de genética inversa de VPIC rP18 (Lan *et al.*, 2009, J Virol 83:6357-6362), los inventores generaron de forma satisfactoria virus recombinantes que portaban mutaciones individuales en la RNasa, que fueron confirmadas por secuenciación. Los 5 mutantes de RNasa, junto con el rP18 TS que provoca una infección virulenta en cobayas y el VPIC rP2 que provoca una infección avirulenta, se usaron para infectar células epiteliales de las vías respiratorias humanas A549 a MOI=1. Mediante el ensayo biológico rNDV-GFP se cuantificaron las producciones de IFN tipo I a las 12 hpi y 24 hpi (Park *et al.*, 2003, J Virol 77:1501-1511). Tanto rP2 como rP18 produjeron niveles bajos de IFN, similares a la infección simulada, como lo demuestran los altos niveles de expresión de GFP (Fig. 21B). Esto no es sorprendente ya que las proteínas NP de ambas cepas codifican un dominio ARNasa funcional y no parecen diferir en su capacidad para suprimir la producción de IFN (Lan *et al.*, 2008, Arch Virol 153:1241-1250). Por el contrario, los mutantes de ARNasa produjeron significativamente más IFN, como se demuestra por la expresión enormemente reducida de GFP (Fig. 21B). Por lo tanto, la actividad de ARNasa de NP es necesaria para la inhibición eficaz de los IFN tipo I en células infectadas por virus.

Se determinó la cinética del crecimiento vírico en células Vero deficientes para IFN y en células A549 competentes para IFN, a una moi = 0,01. Los 5 mutantes replicaron bien en las células Vero, alcanzando las 10⁶ ufp/ml a las 48 hpi, aunque a ~ 0,5-1 log más bajo que el rP18 TS (Fig. 22A, izquierda). En fuerte contraste, estos virus mutantes para ARNasa apenas crecieron en las células A549 (Fig. 22A, derecha). Los resultados de los inventores sugieren que la actividad ARNasa de la NP no es esencial para el ciclo de vida básico del virus, pero es necesaria para la replicación vírica productiva en las células competentes para IFN, lo que concuerda con los datos publicados recientemente sobre el doble mutante de VLAS (D389A/G392A) (Carnec *et al.*, 2011, J Virol 85:12093-12097).

Para comparar la virulencia vírica *in vivo*, los inventores infectaron 6 cobayas Hartley exogámicas por vía

intraperitoneal con 1×10^4 ufp de cada virus, como se ha descrito anteriormente (Lan *et al.*, 2009, J Virol 83:6357-6362, Kumar *et al.*, 2012, Virology 433:97-103, McLay *et al.*, 2013, J Virol 87:6635-6643). Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité institucional de cuidado y uso de animales (IACUC, forma siglada de *Institutional Animal Care and Use Committee*) de la Universidad de Minesota. Los animales se controlaron a diario en cuanto al peso corporal y los signos de enfermedad, durante hasta 18 días, y fueron sacrificados cuando alcanzaron los puntos terminales predeterminados (moribundos), tal como una pérdida de peso de más del 30 % en comparación con un nomograma, o una temperatura rectal por debajo de 38 °C, en combinación con una pérdida de peso continua. Como cabía esperar, todos los animales infectados con rP2 sobrevivieron y eliminaron el virus, mientras que los animales infectados con rP18 desarrollaron fiebre de inicio temprano, mostraron una disminución significativa del peso corporal comenzando a los 7 dpi y alcanzaron los puntos terminales a los 13 dpi (Fig. 22B). Los virus mutantes para la ARNasa provocaron desenlaces variables de la enfermedad (Fig. 22B y Tabla 1). Todos los animales infectados con el virus mutante de E382A sobrevivieron sin ninguna evidencia de pérdida de peso corporal, mientras que los animales infectados con cada uno de los otros 3 virus mutantes (D525A, H520A y D457A) mostraron diversos grados de atenuación (Fig. 22B). La mayoría de los animales infectados con D380A, sin embargo, sucumbieron a la infección, aunque en un momento posterior al rP18. Para determinar si aparecían retromutantes de TS, los inventores midieron los niveles de viremia en el punto final y secuenciaron los virus (Tabla 1). Como cabía esperar, los animales moribundos estaban asociados asociaron con viremia alta, mientras que todos los que sobrevivieron tenían niveles de infección por virus muy bajos a indetectables. Sin excepción, los virus aislados de animales infectados con mutantes habían retromutado a la secuencia de TS de la NP (Tabla 1). Esto es altamente improbable que se deba a contaminación por PCR o a error de secuenciación, ya que los virus aislados de otros animales infectados con virus mutantes sometidos a ensayo al mismo tiempo aún contenían las mutaciones esperadas (datos no mostrados). Por lo tanto, los inventores creen que los fenotipos de la enfermedad son provocados por virus TS, incluyendo los retromutantes a TS, y que la gravedad de la enfermedad está determinada por la rapidez con que se produce la retromutación *in vivo* (se descubrió que algunos animales supervivientes portaban bajos niveles de virus TS en el día 18). Los resultados de los inventores sugieren marcadamente un papel esencial de la actividad ARNasa de la NP en la infección por arnavirus *in vivo*.

Tabla 1. Cobayas infectadas con los respectivos VPIC recombinantes

Cepas recombinantes de VPIC	Enfermedad	Viremia ¹ (UFP/ml)	Secuencias víricas ²
rP2 ³	sobrevivió	ND ⁴	
rP18	moribundo	2,00E+06	
	moribundo	5,80E+05	
	moribundo	2,80E+05	
	moribundo	1,80E+06	
	moribundo	2,30E+05	
	moribundo	8,00E+05	
D380A	moribundo	5,00E+04	inversión al TS
	moribundo	3,10E+05	inversión al TS
	moribundo	3,30E+06	inversión al TS
	moribundo	1,60E+04	inversión al TS
	moribundo	5,00E+04	inversión al TS
	sobrevivió	ND	
E382A	sobrevivió	ND	
	sobrevivió	2,13E+03	inversión al TS
	sobrevivió	ND	
	sobrevivió	9,00E+02	inversión al TS
	sobrevivió	ND	
	sobrevivió	ND	
D525A	moribundo	7,50E+04	inversión al TS
	moribundo	6,25E+04	inversión al TS
	moribundo	1,75E+05	inversión al TS
	moribundo	1,40E+04	inversión al TS
	moribundo	2,40E+04	inversión al TS
	moribundo	2,10E+05	inversión al TS
H520A	moribundo	5,75E+05	inversión al TS
	sobrevivió	ND	
	moribundo	7,50E+05	inversión al TS
	moribundo	ND	
	moribundo	ND	
	moribundo	ND	

(continuación)

Cepas recombinantes de VPIC	Enfermedad	Viremia ¹ (UFP/ml)	Secuencias víricas ²
D457A	sobrevivió	ND	
	sobrevivió	ND	
	sobrevivió	ND	
	sobrevivió	6,20E+02	inversión al TS
	moribundo	5,50E+04	inversión al TS
	moribundo	1,10E+05	inversión al TS

¹, Títulos de virus en la sangre recogida en el momento de la eutanasia cuando los animales alcanzaron puntos terminales o el día 18 posinfección.

², Secuencias de virus aislados de los animales en el momento de la eutanasia cuando los animales alcanzaron puntos terminales o el día 18 posinfección.

5 ³, Los 6 animales en el grupo infectado con rP2 sobrevivieron sin viremia detectable el día 18 posinfección.

⁴, ND, no detectable por ensayo de placas

10 Para examinar el papel (o papeles) de la ARNasa en la infección vírica temprana y la respuesta inmunitaria innata del hospedador en animales infectados, los inventores controlaron la propagación vírica y cuantificaron genes antivíricos innatos 1 dpi y 3 dpi. El día 1, se detectaron virus a niveles bajos en el hígado y el bazo de animales infectados con rP18 y en los hígados de algunos animales infectados con rP2 y los virus mutantes para ARNasa (Fig. 23A). El día 3, tanto rP18 como rP2 replicaron a niveles relativamente altos, tanto en hígado como en bazo. Por el contrario, los virus mutantes para ARNasa parecieron haberse eliminado de los hígados y solo se detectaron en unos pocos bazos a niveles muy bajos (Fig. 23A). Se cuantificaron por qRT-PCR los genes representativos de la respuesta inmunitaria innata, IFN- α 1, IFN- β 1, ISG15, IRF7, RIG-I y MDA5, en células de la cavidad peritoneal en el día 1 (Fig. 23B). Estos genes fueron altamente activados por los virus mutantes para ARNasa pero no por los virus TS (rP2 y rP18), lo que demuestra que NP RNasa es necesaria para la supresión inmunitaria innata inducida por arnavirus *in vivo*.

20 En resumen, el estudio de los inventores con mutantes de ARNasa de VPIC recombinante no solo ha confirmado el importante papel de la NP RNasa en la supresión de IFN de tipo I y la replicación vírica *in vitro*, sino que también proporcionó una prueba inequívoca de su papel esencial en la supresión inmunitaria innata temprana para permitir el establecimiento de una infección productiva *in vivo*. Dado que el mecanismo de supresión de IFN dependiente de la NP RNasa está conservado entre arnavirus (Jiang *et al.*, 2013, J Biol Chem 288:16949-16959), los resultados de los inventores pueden extrapolarse a otros arnavirus patógenos e implican a la NP RNasa como una diana ideal para el desarrollo de antivirales.

Ejemplo 3

30 El vector de vacuna basado en arnavirus suministra dos antígenos y confiere inmunidad frente a cada uno de los antígenos

1. Generación de vectores de vacuna viva rP18tri que expresan antígenos dobles del virus de la gripe HA y NP

35 El ejemplo 1 divulga un sistema de rVPIC trisegmentado competente para replicación (rP18tri) y, usando este vector rP18tri para expresar el antígeno HA (abreviada como H) o NP (P) del virus de la gripe, se demostró que el vector puede inducir fuertes respuestas de anticuerpos y CTL en ratones. Para determinar si se puede usar una sola partícula de virión de rP18tri para suministrar los genes de HA y NP, se generaron los segmentos de ARN genómico vírico S1 y S2, para que codifiquen los genes de HA y NP del virus de la gripe, respectivamente. Mediante el uso de distintas combinaciones de plásmidos en las reacciones de transfección, los inventores han generado satisfactoriamente los vectores de vacuna viva rP18tri-P/H y rP18tri-H/P, que codifican los genes HA y NP en distintos segmentos S, como se ilustra en la Fig. 24A. Como vector de control, se generó también el vector rP18tri que codifica el gen indicador eGFP en los dos segmentos S1 y S2, rP18tri-G/G. Para examinar la expresión de antígenos, se infectaron células Vero con rP18tri-G/G, rP18tri-P/H y rP18tri-H/P, respectivamente. A las 24 hpi, se examinaron las células por EIF en cuanto a la expresión de HA y NP, usando anticuerpos de ratón anti HA y anti NP, respectivamente, seguido de detección con un anticuerpo anti ratón conjugado con PE. Se detectó la expresión de las proteínas HA y NP en las células infectadas con rP18tri-P/H y rP18tri-H/P pero no en las infectadas con el vector de control rP18tri-G/G. El menor número de células expresando HA y NP por la infección con rP18tri-H/P que con el rP18tri-P/H se debe a un título vírico utilizado en la infección más bajo (Fig. 24B). El posterior análisis del crecimiento vírico en células BHK-21 a una moi de 0,01 sugiere que rP18tri-P/H y rP18tri-H/P replican con una cinética similar, que son <0,5 log más bajas que con el control de vector rP18tri-G/G (Fig. 24C).

2. Los vectores de vacuna para antígenos dobles HA/NP pueden inducir inmunidad protectora en ratones.

55 Para probar la inmunidad protectora de los vectores vivos rP18tri-P/H y rP18tri-H/P *in vivo*, los inventores inmunizaron un grupo de ratones (n>=3) con el vector de control rP18tri-G/G, con rP18tri-P/H o con rP18tri-H/P, a 1×10^4 ufp por la vía IM, se reforzó con los mismos vectores 14 días después y se sometió a un desafío con una dosis letal del virus de

la gripe A/PR8 adaptado a ratón (10x DLM_{50}) 14 días después de la vacunación. Todos los ratones inmunizados con vector de control sucumbieron a la infección el día 6, mientras que todos los ratones que recibieron rP18tri-P/H o rP18tri-H/P sobrevivieron al desafío sin signos de enfermedad ni pérdida de peso corporal (Fig. 25A). En comparación con los ratones inmunizados con vector de control, que tenían títulos víricos altos (2-10 x10⁵ ufp/g) en los pulmones a los 3 y 6 dpi, los ratones inmunizados con rP18tri-P/H o rP18tri-H/P (n=3 en cada grupo) no tenían virus detectables a los 6 dpi y solo uno de los tres tenía un nivel relativamente bajo de virus (<5x10³ ufp/g) a los 3 dpi (Fig. 25B). Los datos de los inventores sugieren que los vectores víricos que expresan el doble antígeno pueden inducir una fuerte inmunidad protectora frente al virus de la gripe, la cual es conferida por el anticuerpo neutralizante específico para HA.

3. El vector de antígeno doble H1/H3 induce anticuerpos neutralizantes equilibrados para HA.

Se determinó si se pueden usar dos subtipos de HA distintos para inducir anticuerpos neutralizantes con la misma eficacia. Para este fin, los inventores clonaron el gen de HA H3 del A/x31 (subtipo H3N2 del virus de la gripe) en el segmento S2 y que cuando se transfecta con el segmento L de longitud completa, y el segmento S1 que codifica HA HI del A/PR8, se puede generar el vector vivo rP18tri-H3/H1 (Fig. 26A). Como controles, los inventores también generaron los vectores rP18tri que codifican eGFP en el segmento S2 y H1 o H3 en el segmento S1, respectivamente, llamados rP18tri-G/H1 o rP18tri-G/H3 (Fig. 26A). Para probar su inmunogenicidad, grupos de ratones C57BL6 (n = 3 por grupo) fueron cebados y reforzados con los tres vectores respectivamente en un intervalo de 14 días a través de la vía IM. Se midieron en sangre recogida 14 días después de la sensibilización y el refuerzo los niveles de anticuerpos neutralizantes frente a A/PR8/H1N1 y A/x31/H3N2 (Fig. 26B, panel superior). Los vectores rP18tri que codifican subtipos de HA individuales, rP18tri-G/H1 y rP18tri-G/H3, indujeron cada uno fuertes anticuerpos neutralizantes homotípicos, que aumentaron con una dosis de refuerzo, pero no indujeron niveles detectables de anticuerpos de reacción cruzada después de la sensibilización o el refuerzo. El vector de antígeno doble rP18tri-H1/H3 indujo anticuerpos neutralizantes para H1 y H3 que aumentaron tras una dosis de refuerzo y el nivel de cada tipo anticuerpo neutralizante era comparable al inducido por los vectores de antígeno individuales respectivos (Fig. 26B, parte superior). Se obtuvieron hallazgos similares con ratones Balb/c (Fig. 26B, parte inferior). Considerados en su conjunto, los datos de los inventores sugieren enfáticamente que el vector de antígeno doble H1/H3 induce en ratones anticuerpos neutralizantes equilibrados frente a ambos antígenos. En otras palabras, no hay preferencia (sesgo) de producción de anticuerpos neutralizantes frente a uno u otro antígeno HA.

4. Inducción de anticuerpos neutralizantes heterosubtípicos mediante una estrategia de sensibilización y refuerzo con distintos subtipos de HA

Estudios recientes han sugerido que se pueden generar anticuerpos ampliamente neutralizantes mediante vacunaciones de sensibilización y refuerzo, o de infecciones secuenciales (Wei *et al.*, 2010, Science 329:1060-1064, Wei *et al.*, 2012, Sci Transl Med 4:147ra114, Miller *et al.*, 2013, Sci Transl Med 5:198ra107, Wrammert *et al.*, 2011, J Exp Med 208:181-193, Krammer *et al.*, 2012, J Virol 86:10302-10307, Miller *et al.*, 2013, J Infect Dis 207:98-105, Margine *et al.*, 2013, J Virol 87:4728-4737). Como el vector rP18tri potencia las respuestas inmunitarias tras una dosis de refuerzo, se analizó si puede inducir inmunidad de reacción cruzada utilizando una estrategia de sensibilización y refuerzo con distintos subtipos de HA. Para este fin, se generaron vectores vivos rP18tri-P/H1 y rP18tri-P/H3, codificando cada uno NP de A/PR8, una proteína vírica conservada (véase el número de referencia de GenBank NP_040982.1) que se sabe suscita respuestas de linfocitos T, junto con HA H1 (A/PR8) o H3 (x31) (Fig. 27A). Se sensibilizaron ratones con rP18tri-P/H1, se reforzaron con rP18tri-P/H3, y se reforzaron nuevamente con rP18tri-P/H1, cada vez en un intervalo de 14 días. Como cabía esperar, después de la sensibilización (7 dps) se detectaron CTL específicos para NP, aumentaron significativamente tras una dosis de refuerzo (7 dpr) y aún permanecieron en niveles altos (3-5 %) después de una segunda dosis de refuerzo (Fig. 27B). Se recogió sangre 14 días después de cada administración y se analizó en cuanto a los niveles de anticuerpos neutralizantes contra A/PR8, A/x31 y A/WSN. Tras la exposición de los mismos antígenos HA se indujeron de manera elevada anticuerpos neutralizantes específicos para los virus homólogos A/PR8 (H1) y A/31 (H3) y, en general, no se potenciaron por el refuerzo con HA heteróloga, mientras que aumentaron constantemente con las dosis de refuerzo anticuerpos neutralizantes frente al virus A/WSN (H1) heterosubtípico (Fig. 27C). Estos ratones inmunizados mostraron una supervivencia significativamente mejorada después de una exposición letal al virus heterosubtípico A/WSN (Fig. 27D). Considerados en su conjunto, los datos de los inventores sugieren que la sensibilización y refuerzo con subtipos de HA heterólogos utilizando el vector rP18tri pueden suscitar anticuerpos neutralizantes con reactividad cruzada y provocar una protección cruzada frente a la exposición al virus de la gripe heterosubtípico.

5. El vector rP18tri puede inducir respuestas humorales y de linfocitos T a través de vía oral.

Para determinar si el vector rP18tri se puede administrar convenientemente por vía oral, se inmunizaron ratones C57BL6 con 1x10⁴ ufp del vector rP18tri-G (n=3) o rP18tri-P/H (n=4), a través de una sonda oral, y se reforzaron con el mismo vector de 42 días más tarde. A los 7 días postsensibilización y postrefuerzo se midieron los linfocitos T efectores positivos para tetrámero de NP (CD8 + CD44^{alto}) mediante el análisis de tetrámero de NP establecido. A los 7 días postsensibilización, dos de cada tres ratones analizados, de los ratones inmunizados con rP18tri-P/H, tenían células NP+CD8+CD44^{alto} (1,24 % y 0,55 %) que eran claramente más altas que el nivel de fondo observado en los ratones inmunizados con vector (0,13 % y 0,09 %). Las células efectoras específicas para NP aumentaron significativamente a los 7 días postrefuerzo, variando del 5,7 al 7,1 % en los 4 ratones inmunizados (Fig. 28A). Se

observaron patrones similares para los anticuerpos neutralizantes. Dos de cada cuatro ratones inmunizados mostraron un título de IHA positivo (IHA = 20) a los 14 días postsensibilización. A los 42 días postsensibilización, los 4 ratones mostraron títulos de IHA de un promedio de 40. Después de una dosis de refuerzo, el título de IHA aumentó significativamente para los 4 ratones, variando de 80 a 160 (Fig. 28B). Considerados en su conjunto, los datos de los inventores sugieren enfáticamente que el vector rP18tri puede inducir altos niveles de respuestas humoral y de linfocitos T a través de vía oral después de una dosis de refuerzo.

6. El vector rP18tri inactivado puede inducir respuestas humorales y de linfocitos T.

Se determinó si el vector rP18tri inactivado puede inducir inmunidad por vacuna. Se usó el vector de vacuna rP18tri-P/H vivo o tratado con peróxido de hidrógeno (es decir, vector de vacuna inactivado) para inmunizar ratones con 2 dosis a un intervalo de 34 días. Inmediatamente después de la sensibilización (7 días postsensibilización, 7 dps), no se detectaron anticuerpos neutralizantes ni linfocitos T específicos para NP. Sin embargo, después de una dosis de refuerzo (7 días posrefuerzo, 7 dpr) con el vector de vacuna inactivado se detectaron altos niveles de linfocitos T efectoros específicos para NP (Fig. 29, izquierda). 34 días postsensibilización (34 dps) se detectaron en los tres ratones anticuerpos neutralizantes a un nivel bajo (IHA=20), que aumentaron significativamente después de una dosis de refuerzo (14 días posrefuerzo, 14 dpr), variando de 40 a 80 con el vector de vacuna inactivado (Fig. 29, derecha). Vale la pena señalar que los niveles tanto de linfocitos T como de respuestas humorales inducidos por el vector de vacuna rP18tri-P/H químicamente inactivado son significativamente más bajos que los inducidos por el vector de vacuna viva. No obstante, que el rP18tri-P/H inactivado aún pueda inducir respuestas humorales y de linfocitos T después de una dosis de refuerzo sugiere la versatilidad de este vector vírico como plataforma vacunal, tanto de vacunas vivas como inactivadas.

7. El vector rP18tri indujo inmunidad protectora frente al virus P18 virulento en una modelo de cobaya.

Se obtuvo virus P18 TS después de pases seriados del virus Pichindé (VPIC) en cobayas, que provoca una enfermedad similar a la fiebre hemorrágica en los animales, el cual se ha utilizado como un modelo sustituto seguro para estudiar la patogénesis de la infección por el virus de la fiebre de Lassa en seres humanos (Jahrling *et al.*, 1981, *Infect Immun* 32:872-880, Aronson *et al.*, 1994, *Am J Pathol* 145:228-235, Liang *et al.*, 2009, *Ann N Y Acad Sci* 1171 Supl. 1:E65-74). En comparación con el virus P18 TS, los vectores rP18tri trisegmentados crecen al menos 1 log más bajo *in vitro*. Además, los inventores determinaron el potencial de virulencia del vector rP18tri-G en cobayas. Las cobayas infectadas con 1×10^4 ufp de virus RP18 desarrollaron fiebre de inicio temprano, perdieron peso rápidamente después de 7 días posinfección, y alcanzaron los puntos terminales en el día 14 (Fig. 30A). Por el contrario, las cobayas infectadas con 1×10^6 ufp de rP18tri-G (título 100 veces mayor que el control de rP18) mostraron un crecimiento en peso corporal similar al de los animales infectados de forma simulada y no experimentaron fiebre de más de 1 día (Fig. 30A).

Se determinó si estos vectores rP18tri no patógenos podían inducir en cobayas una inmunidad protectora frente a una exposición letal de rP18. Las cobayas se inyectaron con solución salina tamponada con fósforo (PBS) para representar la infección simulada o con 1×10^4 ufp de rP18tri-G a través de vía IP y, 14 días después, se expusieron a una dosis letal de virus rP18. Las cobayas inmunizadas con PBS (n=3) desarrollaron fiebre pronto y perdieron peso corporal de forma significativa, y el día 11 todos los animales alcanzaron los puntos terminales predeterminados (Fig. 30B). Por el contrario, las cobayas inmunizadas con rP18tri-G (n=3) estaban completamente protegidas, sin pérdida apreciable de peso corporal (Fig. 30B). Es probable que la inmunidad protectora frente al VPIC esté mediada por respuestas de linfocitos T, ya que los anticuerpos neutralizantes aún no se habían desarrollado en el momento de la exposición. Estudios anteriores han demostrado la protección cruzada entre distintos arenavirus, tales como VCML y VPIC, virus Lassa y Mopeia, los virus del complejo Junín y Tacaribe, y los arenavirus apatógenos se han explorado como vacunas vivas (revisado en Olschlager *et al.*, 2013, *PLoS Pathog* 9:e1003212). Los inventores proponen que el vector rP18tri que incorpora epítomos protectores de linfocitos T en proteínas de VPIC puede inducir inmunidad de protección cruzada frente a otros arenavirus patógenos. Con una capacidad de codificar hasta dos antígenos adicionales, el vector rP18tri puede desarrollarse como un vector de vacuna doble (o triple) frente a arenavirus patógeno y a otro patógeno (o patógenos) deseado.

En resumen, se desarrolló un nuevo vector vírico vivo rP18tri basado en el virus Pichindé (VPIC) que empaqueta 3 segmentos de ARN y codifica 2 antígenos de proteínas extrañas. El vector vírico se atenuó *in vitro* e *in vivo*. Usando la HA del virus de la gripe como antígeno modelo, rP18tri-G/H puede inducir inmunidad protectora de larga duración en ratones. El vector rP18tri puede inducir fuertes respuestas humorales en ratones y cobayas, y altos niveles de linfocitos T efectoros específicas para virus. Las respuestas de anticuerpos y de linfocitos T inducidas por el vector rP18tri aumentaron significativamente mediante una vacunación de refuerzo y estuvieron en niveles altos incluso después de cuatro aplicaciones, una característica exclusiva de este vector vírico vivo, que es ideal para una estrategia de vacunación de sensibilización y refuerzo. El vector se puede proporcionar a través de diversas vías, incluyendo intramuscular (IM), intraperitoneal (IP), intranasal (IN) y oral. La sensibilización y el refuerzo con distintas proteínas HA de distintas cepas del virus de la gripe indujeron inmunidad heterosubtípica, por lo tanto, existe en potencial para el desarrollo de vacunas universales para la gripe. El rP18tri-P/H químicamente inactivado indujo respuestas humorales y CTL después de una dosis de refuerzo. El vector rP18tri indujo inmunidad protectora frente al virus virulento rP18, por lo tanto, existe el potencial de desarrollar vacunas de reacción cruzada frente a otros arenavirus patógenos, tal

como el virus de la fiebre de Lassa, y vacunas dobles (triples) frente a combinaciones de otros patógenos.

5 En el caso de que exista alguna inconsistencia entre la divulgación de la presente solicitud y la divulgación (o divulgaciones) de cualquier documento citado en el presente documento, prevalecerá la divulgación de la presente solicitud. La descripción detallada y los ejemplos anteriores se han proporcionado únicamente para mayor claridad. No se deben entender limitaciones innecesarias a partir de ahí. La invención no se limita a los detalles exactos mostrados y descritos, las variaciones obvias para un experto en la materia estarán incluidas dentro de la invención definida por las reivindicaciones.

10 A menos que se indique otra cosa, todos los números que expresan cantidades de componentes, pesos moleculares y otros, utilizados en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, deben entenderse como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos establecidos en la memoria descriptiva y las reivindicaciones son aproximaciones que pueden variar
15 dependiendo de las propiedades deseadas que se buscan obtener mediante la presente invención. Como mínimo, y no en un intento de limitar la doctrina de los equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debe interpretarse al menos a la luz del número de dígitos significativos informados y mediante la aplicación de técnicas de redondeo habituales.

20 A pesar de que los intervalos numéricos y parámetros que establecen el amplio alcance de la invención sean aproximaciones, los valores numéricos establecidos en los ejemplos específicos se informan de la forma más precisa posible. Todos los valores numéricos, sin embargo, contienen de forma inherente un intervalo que es necesariamente el resultado de la desviación típica que se encuentra en sus respectivas mediciones de ensayo.

25 Todos los encabezados son para conveniencia del lector y no deben usarse para limitar el significado del texto que sigue al encabezado, a menos que así se especifique.

LISTADO DE SECUENCIAS

30 <110> REGENTES DE LA UNIVERSIDAD DE MINNESOTA Liang, Yuying Ly, Hinh
<120> SISTEMA DE GENÉTICA INVERSA PARA EL VIRUS PICHINDÉ Y MÉTODOS DE USO
<130> 110.04430201
35 <150> US 62/053.443
<151> 22-09-2014
<160> 14
40 <170> PatentIn versión 3.5
<210> 1
<211> 95
<212> PRT
45 <213> mammarenavirus Pichindé
<400> 1

ES 2 746 150 T3

Met Gly Leu Arg Tyr Ser Lys Glu Val Arg Lys Arg His Gly Asp Glu
 1 5 10 15

Asp Val Val Gly Arg Val Pro Met Thr Leu Asn Leu Pro Gln Gly Leu
 20 25 30

Tyr Gly Arg Phe Asn Cys Lys Ser Cys Trp Phe Val Asn Lys Gly Leu
 35 40 45

Ile Arg Cys Lys Asp His Tyr Leu Cys Leu Gly Cys Leu Thr Lys Met
 50 55 60

His Ser Arg Gly Asn Leu Cys Glu Ile Cys Gly His Ser Leu Pro Thr
 65 70 75 80

Lys Met Glu Phe Leu Glu Ser Pro Ser Ala Pro Pro Tyr Glu Pro
 85 90 95

<210> 2
 <211> 2194
 <212> PRT
 <213> mammarenavirus Pichindé

5

<400> 2

Met Glu Glu Tyr Val Phe Glu Leu Lys Asp Ile Val Arg Lys Trp Val
 1 5 10 15

Pro Glu Trp Glu Glu Leu Ser Glu Gln Lys Asn Asn Val Leu Ala Gln
 20 25 30

10

ES 2 746 150 T3

Val Lys Asp Arg Ala Ile Thr Ile Glu Gly Leu Lys Leu Leu Ser Met
 35 40 45

Leu Val Glu Val Asp Ser Cys Lys Lys His Ser Cys Lys His Asn Thr
 50 55 60

Lys Met Thr Val Asn Ala Ile Leu Arg Glu Leu Arg Val Thr Cys Pro
 65 70 75 80

Thr Leu Pro Asp Val Thr Pro Asp Gly Tyr Cys Met Val Gly Asp Val
 85 90 95

Leu Ile Leu Leu Glu Val Phe Val Arg Thr Ser Gln Glu Ala Phe Glu
 100 105 110

Lys Lys Tyr Asn Gln Asp Phe Leu Lys Leu Leu Gln Leu Ser Ser Asp
 115 120 125

Leu Lys Arg Gln Asn Ile Thr Leu Val Pro Val Ile Asp Gly Arg Ser
 130 135 140

Ser Tyr Tyr Val Glu Phe Val Pro Asp Trp Val Val Glu Arg Leu Arg
 145 150 155 160

Trp Leu Leu Leu Lys Leu Met Asp Gly Leu Arg Thr Ser Gly Glu Glu
 165 170 175

Val Glu Glu Leu Glu Tyr Glu Arg Leu Ile Ser Ser Leu Ser Ser Leu
 180 185 190

Glu Asn Gln Ser Leu Gly Leu Glu Ser Leu Leu Ala Val Lys Glu Arg
 195 200 205

Gly Leu Pro Tyr Lys Val Arg Leu Glu Lys Ala Leu Met Ser Gly Ile
 210 215 220

Asn Asn Lys Leu Thr Thr Asp Gln Cys Arg Thr Lys Ile Met Glu Ile
 225 230 235 240

Phe Gln Gln Phe Lys Met Leu Gln Leu Ala Gly Gln Leu Asp Arg Lys
 245 250 255

Leu Gln Ala Thr Asp Arg Glu Asp Met Ile Ser Arg Leu Gln Asn His
 260 265 270

Glu Phe Ile Gln Cys Ser Val Lys Asp Val Pro Lys Ser Glu Ile Arg
 275 280 285

ES 2 746 150 T3

Leu Cys Glu Phe Cys Ser Val His Ile Leu Gly Ile Ile Gly Gln Leu
 290 295 300
 Arg Gln Ser Glu Val Lys His Ser Ser Thr Glu Ser Arg Glu Tyr Phe
 305 310 315 320
 Arg Val Leu Ser Ile Cys Asn Lys Ile Lys Ser Gln Lys Val Phe Asn
 325 330 335
 Thr Arg Arg Asn Thr Met Leu Val Leu Asp Leu Ile Met Tyr Asn Ile
 340 345 350
 Leu Cys Asp Leu Asp Lys Ser Ser Pro Gly Ala Val Phe Arg Glu Val
 355 360 365
 Leu Leu Met Gln Gly Leu Pro Ser Val Asn Asp Arg Leu Ile Asn Val
 370 375 380
 Asp Phe Leu Met Glu Gln Ile Thr Lys Lys Phe Ile Lys Asn Pro Asn
 385 390 395 400
 Trp Leu Glu Lys Ala Lys Lys Arg Leu Ser Ser Val Cys Gly Glu Leu
 405 410 415
 Pro Leu Asp Asp Ile Leu Pro Leu Leu Arg Glu Pro Asp Val Glu Tyr
 420 425 430
 Tyr Phe Asn Leu Lys Thr Ser Val Leu Asp Glu Trp Gly Ala Lys Pro
 435 440 445
 Cys Leu Gln Tyr Lys Thr Lys Ser Gln Cys Met Cys Gly Gly Arg Pro
 450 455 460
 Gly Arg Gly Gln Pro Asp Tyr Thr Ile Met Gly Glu Ser Glu Phe Glu
 465 470 475 480
 Glu Leu Leu Lys Thr Leu Ser Ser Leu Ser Leu Ser Leu Ile Asn Ser
 485 490 495
 Met Lys Thr Ala Ala Val Pro Lys Met Lys Val Asn Asn Ala Asp Glu
 500 505 510
 Phe Tyr Gly Lys Val Tyr Cys Asp Glu Val Phe Phe Gln Arg Phe Gly
 515 520 525
 Glu Gly Gly Ser Leu Thr Leu Leu Tyr Gln Lys Thr Gly Glu Arg Ser
 530 535 540

ES 2 746 150 T3

Arg Cys Tyr Ala Val Ala Tyr Arg Ser Lys Ser Gly Gly Leu Tyr Glu
 545 550 555 560
 Thr Lys Ala Ser Phe Tyr Cys Asp Pro Lys Arg Phe Phe Leu Pro Ile
 565 570 575
 Phe Ser Ala Asp Val Ile Gln Arg Thr Cys Val Glu Met Leu Ser Trp
 580 585 590
 Leu Asp Phe Met Ser Gln Pro Leu Leu Asp Ser Val Ser Asp Leu Leu
 595 600 605
 Arg Arg Leu Ile Leu Cys Ile Leu Cys Thr Pro Ser Lys Arg Ile Gln
 610 615 620
 Val Tyr Leu Gln Gly Phe Arg Tyr Tyr Ile Met Ala Phe Val Asn Glu
 625 630 635 640
 Val His Phe Lys Glu Leu Phe Glu Lys Leu Lys Val Val Met Leu Thr
 645 650 655
 Pro Ser Glu Trp Gln Thr Ala Met Leu Ile Asp Asp Leu Ile Leu Leu
 660 665 670
 Val Leu Ser Asn Ser Arg Glu Glu Asp Met Ala Lys Ile Phe Lys Phe
 675 680 685
 Val Leu Asn Val Ser Tyr Leu Cys His Phe Ile Thr Lys Glu Thr Pro
 690 695 700
 Asp Arg Leu Thr Asp Gln Ile Lys Cys Phe Glu Lys Phe Leu Glu Pro
 705 710 715 720
 Lys Leu Lys Phe Asp Ser Val Leu Val Asn Pro Ser Asn Ser Met Glu
 725 730 735
 Leu Pro Thr Glu Glu Glu Glu Lys Met Val His Asp Ile Glu Arg Leu
 740 745 750
 Leu Gly Lys Lys Leu Glu Ser Lys Cys Glu Gly Arg Pro Gly Leu Asn
 755 760 765
 Lys Asp Val Leu Ser Val Cys Leu Ser Leu Phe Asn Ser Ser Ser Leu
 770 775 780
 Glu Val Lys Pro Leu Leu Pro Cys Asp Pro Met Thr Pro Ser Phe Thr

ES 2 746 150 T3

Glu Thr Ser Arg Ile Ser Ser Arg Glu Ser Asn Ser Glu Ser Ile
1040 1045 1050

Ala Lys Arg Leu Asp Gln Ser Phe Phe Thr Asn Ser Ser Leu Arg
1055 1060 1065

Asn Leu Cys Phe Tyr Ser Asp Glu Ser Pro Thr Glu Arg Ser Gly
1070 1075 1080

Val Ser Thr Asn Val Gly Arg Leu Lys Phe Gly Leu Ser Tyr Lys
1085 1090 1095

Glu Gln Val Gly Gly Asn Arg Glu Leu Tyr Val Gly Asp Leu Asn
1100 1105 1110

Thr Lys Leu Thr Thr Arg Leu Ile Glu Asp Tyr Ser Glu Ser Leu
1115 1120 1125

Met Gln Asn Met Arg Tyr Thr Cys Leu Asn Asn Glu Lys Glu Phe
1130 1135 1140

Glu Arg Ala Leu Leu Asp Met Lys Ser Val Val Arg Gln Ser Gly
1145 1150 1155

Leu Ala Val Ser Met Asp His Ser Lys Trp Gly Pro His Met Ser
1160 1165 1170

Pro Val Ile Phe Ala Ala Leu Leu Lys Gly Leu Glu Phe Lys Leu
1175 1180 1185

Lys Asp Gly Ser Glu Val Pro Asn Ala Ala Val Ile Asn Ile Leu
1190 1195 1200

Leu Trp His Ile His Lys Met Val Glu Val Pro Phe Asn Val Val
1205 1210 1215

Glu Ala Tyr Met Lys Gly Phe Leu Lys Arg Gly Leu Gly Met Met
1220 1225 1230

Asp Lys Gly Gly Cys Thr Ile Ala Glu Glu Phe Met Phe Gly Tyr
1235 1240 1245

Phe Glu Lys Gly Lys Val Pro Ser His Ile Ser Ser Val Leu Asp
1250 1255 1260

Met Gly Gln Gly Ile Leu His Asn Thr Ser Asp Leu Tyr Gly Leu
1265 1270 1275

ES 2 746 150 T3

Ile Thr Glu Gln Phe Ile Asn Tyr Ala Leu Glu Leu Cys Tyr Gly
 1280 1285 1290

Ala Arg Phe Ile Ser Tyr Thr Ser Ser Asp Asp Glu Ile Met Leu
 1295 1300 1305

Ser Leu Asn Glu Gly Phe Lys Phe Lys Asp Arg Asp Glu Leu Asn
 1310 1315 1320

Val Glu Leu Val Leu Asp Cys Met Glu Phe His Tyr Phe Leu Ser
 1325 1330 1335

Asp Lys Leu Asn Lys Phe Val Ser Pro Lys Thr Val Val Gly Thr
 1340 1345 1350

Phe Ala Ser Glu Phe Lys Ser Arg Phe Phe Ile Trp Ser Gln Glu
 1355 1360 1365

Val Pro Leu Leu Thr Lys Phe Val Ala Ala Ala Leu His Asn Ile
 1370 1375 1380

Lys Ala Lys Ala Pro Asn Gln Gln Ala Asp Thr Ile Asp Thr Ile
 1385 1390 1395

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

Ala Ile Ala Lys Arg Thr Asn Ser Met Ile Ile Tyr Ser Gly Phe
 1415 1420 1425

Pro Asn Asp Pro Phe Leu Cys Leu Glu Glu Met Asp Val Leu Asp
 1430 1435 1440

Trp Val Asn Gly Ser Arg Gly Tyr Arg Leu Gln Arg Ser Ile Glu
 1445 1450 1455

Thr Leu Phe Pro Asp Asp Leu Leu Leu Ser Ile Ile Arg Lys Ala
 1460 1465 1470

Cys Arg Lys Ile Phe Tyr Lys Ile Gln Ser Gly Ala Leu Glu Glu
 1475 1480 1485

Ser Tyr Ile Val Thr Thr Leu Gln Gln Ser Pro Asp Asp Cys Leu
 1490 1495 1500

Lys Gln Leu Leu Glu Thr Cys Asp Val Glu Thr Glu Ala Ile Glu
 1505 1510 1515

ES 2 746 150 T3

Asp Ala Leu Asn Ile Arg Trp Leu Asn Leu Arg Val His Gly Asp
 1520 1525 1530

Leu Arg Leu Val Leu Arg Thr Lys Leu Met Ser Thr Thr Arg Thr
 1535 1540 1545

Val Gln Arg Glu Glu Ile Pro Ser Leu Val Lys Ser Val Gln Ser
 1550 1555 1560

Lys Leu Ser Lys Asn Tyr Val Arg Gly Ala Lys Lys Ile Leu Ala
 1565 1570 1575

Asp Ala Ile Asn Lys Ser Ala Phe Gln Ser Ser Ile Ala Ser Gly
 1580 1585 1590

Phe Ile Gly Val Cys Lys Ser Met Gly Ser Lys Cys Val Arg Asp
 1595 1600 1605

Gly Lys Gly Gly Phe Lys Tyr Ile Arg Asp Ile Thr Ser Lys Ile
 1610 1615 1620

Ile Leu His Arg Asp Cys His Phe Cys Asn Gln Arg Lys Gly Val
 1625 1630 1635

Tyr Cys Lys Ala Ala Leu Gly Glu Val Ser Glu Tyr Ser Arg Pro
 1640 1645 1650

Leu Ile Trp Asp Tyr Phe Ala Leu Val Leu Thr Asn Ala Cys Glu
 1655 1660 1665

Leu Gly Asn Trp Val Phe Gln Lys Ala Glu Val Pro Lys Ile Val
 1670 1675 1680

Thr His Leu Asn Asn Pro Asn His Phe Trp Pro Ile Lys Pro Ser
 1685 1690 1695

Thr His Ser Glu Leu Glu Asp Lys Val Gly Ile Asn His Ile Leu
 1700 1705 1710

Tyr Ser Ile Arg Arg Asn Phe Pro Thr Leu Phe Asp Glu His Ile
 1715 1720 1725

Ser Pro Phe Leu Ser Asp Leu Asn Met Leu Arg Leu Ser Trp Val
 1730 1735 1740

Gln Arg Ile Lys Phe Leu Asp Leu Cys Val Ala Ile Asp Ile Thr

ES 2 746 150 T3

1745		1750		1755
Ser Glu Cys Leu Gly Ile Val	Ser His Ile Ile Lys	His Arg Arg		
1760	1765	1770		
Glu Glu Leu Tyr Ile Val Lys	Gln Asn Glu Leu Ala	Met Ser His		
1775	1780	1785		
Ser Arg Glu Ser His Pro Leu	Glu Arg Gly Phe Asn	Leu Glu Pro		
1790	1795	1800		
Glu Glu Val Cys Thr Asn Phe	Leu Ile Gln Ile Leu	Phe Glu Ser		
1805	1810	1815		
Met Leu Val Pro Val Ile Met	Ser Thr Ser Gln Phe	Lys Lys Tyr		
1820	1825	1830		
Phe Trp Phe Gly Glu Leu Glu	Leu Leu Pro Asn Asn	Ala Gln His		
1835	1840	1845		
Asp Leu Lys Gln Leu Thr Gln	Phe Ile Cys Asp Cys	Lys Lys Asn		
1850	1855	1860		
Asn Thr Ser Arg Thr Met Asn	Leu Asp Asp Leu Asp	Val Gly Phe		
1865	1870	1875		
Val Ser Ser Lys Leu Ile Leu	Ser Cys Val Asn Leu	Asn Ile Ser		
1880	1885	1890		
Val Phe Ile Asn Glu Leu Asp	Trp Val Asn Arg Asp	Asn Tyr Glu		
1895	1900	1905		
Asn Ile Glu Gln Leu Ile Leu	Ala Ser Pro Ser Glu	Val Ile Pro		
1910	1915	1920		
Ile Glu Leu Asn Leu Thr Phe	Ser His Lys Arg Val	Ser His Lys		
1925	1930	1935		
Phe Arg Tyr Glu Arg Ser Thr	Asn Tyr Ile Leu Lys	Leu Arg Phe		
1940	1945	1950		
Leu Ile Glu Arg Glu Ser Leu	Leu Asp Ser Leu Asp	Ser Asp Gly		
1955	1960	1965		
Tyr Leu Leu Leu Asn Pro His	Ser Val Glu Tyr Tyr	Val Ser Gln		
1970	1975	1980		

ES 2 746 150 T3

Ser Ser Gly Asn His Ile Ser Leu Asp Gly Val Ser Leu Leu Val
 1985 1990 1995

Leu Asn Pro Leu Ile Asn Gly Lys Asp Val Leu Asp Phe Asn Asp
 2000 2005 2010

Leu Leu Glu Gly Gln Asp Ile His Phe Lys Ser Arg Ser Thr Val
 2015 2020 2025

Phe Gln Lys Val Arg Ile Asp Leu Lys Asn Arg Phe Lys Asp Leu
 2030 2035 2040

Lys Asn Lys Phe Ser Tyr Lys Leu Ile Gly Pro Asp Val Gly Met
 2045 2050 2055

Gln Pro Leu Ile Leu Glu Gly Gly Leu Ile Lys Glu Gly Asn Arg
 2060 2065 2070

Val Val Ser Arg Leu Glu Val Asn Leu Asp Ser Lys Val Val Ile
 2075 2080 2085

Ile Ala Leu Glu Ala Leu Glu Pro Glu Lys Arg Pro Arg Phe Ile
 2090 2095 2100

Ala Asn Leu Phe Gln Tyr Leu Ser Ser Ala Gln Ser His Asn Lys
 2105 2110 2115

Gly Ile Ser Met Asn Glu Gln Asp Leu Arg Leu Met Ile Glu Asn
 2120 2125 2130

Phe Pro Glu Val Phe Glu His Met Leu His Asp Ala Lys Asp Trp
 2135 2140 2145

Leu Asn Cys Gly His Phe Ser Ile Ile Arg Ser Lys Thr Leu Gly
 2150 2155 2160

Ser Val Met Ile Ala Asp Glu Thr Gly Pro Phe Lys Ile Lys Gly
 2165 2170 2175

Ile Arg Cys Arg Lys Leu Phe Glu Asp Asn Glu Ser Val Glu Ile
 2180 2185 2190

Glu

<210> 3
 <211> 561
 <212> PRT
 <213> mammarenavirus Pichindé
 <400> 3

ES 2 746 150 T3

Met Ser Asp Asn Ile Pro Ser Phe Arg Trp Val Gln Ser Leu Arg Arg
1 5 10 15

Gly Leu Ser Asn Trp Thr His Pro Val Lys Ala Asp Val Leu Ser Asp
20 25 30

Thr Arg Ala Leu Leu Ser Ala Leu Asp Phe His Lys Val Ala Gln Val
35 40 45

Gln Arg Met Met Arg Lys Asp Lys Arg Thr Asp Ser Asp Leu Thr Lys
50 55 60

Leu Arg Asp Met Asn Lys Glu Val Asp Ala Leu Met Asn Met Arg Ser
65 70 75 80

Ile Gln Arg Asp Asn Val Leu Lys Val Gly Gly Leu Ala Lys Glu Glu
85 90 95

Leu Met Glu Leu Ala Ser Asp Leu Asp Lys Leu Arg Lys Lys Val Thr
100 105 110

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

Asn Thr Gln Leu Glu Gln Arg Ala Glu Ile Leu Arg Ser Met Gly Phe
130 135 140

Ala Asn Ala Arg Pro Thr Gly Asn Arg Asp Gly Val Val Lys Ile Trp
145 150 155 160

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

Ala Leu Thr Ile Ala Cys Met Thr Glu Gln Gly Gly Glu Gln Leu Asn
180 185 190

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

Phe Pro Asn Met Thr Asp Leu Glu Lys Leu Thr Gln Gln His Ser Ala
210 215 220

Leu Lys Ile Ile Ser Asn Glu Pro Ser Ala Ile Asn Ile Ser Gly Tyr
225 230 235 240

ES 2 746 150 T3

Asn Leu Ser Leu Ser Ala Ala Val Lys Ala Ala Ala Cys Met Ile Asp
 245 250 255
 Gly Gly Asn Met Leu Glu Thr Ile Gln Val Lys Pro Ser Met Phe Ser
 260 265 270
 Thr Leu Ile Lys Ser Leu Leu Gln Ile Lys Asn Arg Glu Gly Met Phe
 275 280 285
 Val Ser Thr Thr Pro Gly Gln Arg Asn Pro Tyr Glu Asn Leu Leu Tyr
 290 295 300
 Lys Ile Cys Leu Ser Gly Asp Gly Trp Pro Tyr Ile Gly Ser Arg Ser
 305 310 315 320
 Gln Val Gln Gly Arg Ala Trp Asp Asn Thr Thr Val Asp Leu Asp Ser
 325 330 335
 Lys Pro Ser Ala Ile Gln Pro Pro Val Arg Asn Gly Gly Ser Pro Asp
 340 345 350
 Leu Lys Gln Ile Pro Lys Glu Lys Glu Asp Thr Val Val Ser Ser Ile
 355 360 365
 Gln Met Leu Asp Ser Lys Ala Thr Thr Trp Ile Asp Ile Glu Gly Thr
 370 375 380
 Pro Asn Asp Pro Val Glu Met Ala Ile Tyr Gln Pro Asp Thr Gly Asn
 385 390 395 400
 Tyr Ile His Cys Tyr Arg Phe Pro His Asp Glu Lys Ser Phe Lys Glu
 405 410 415
 Gln Ser Lys Tyr Ser His Gly Leu Leu Leu Lys Asp Leu Ala Asp Ala
 420 425 430
 Gln Pro Gly Leu Ile Ser Ser Ile Ile Arg His Leu Pro Gln Asn Met
 435 440 445
 Val Phe Thr Ala Gln Gly Ser Asp Asp Ile Ile Ser Leu Phe Glu Met
 450 455 460
 His Gly Arg Arg Asp Leu Lys Val Leu Asp Val Lys Leu Ser Ala Glu
 465 470 475 480
 Gln Ala Arg Thr Phe Glu Asp Glu Ile Trp Glu Arg Tyr Asn Leu Leu
 485 490 495

ES 2 746 150 T3

Cys Thr Lys His Lys Gly Leu Val Ile Lys Lys Lys Lys Lys Gly Ala
 500 505 510

Ala Gln Thr Thr Ala Asn Pro His Cys Ala Leu Leu Asp Thr Ile Met
 515 520 525

Phe Asp Ala Thr Val Thr Gly Trp Val Arg Asp Gln Lys Pro Met Arg
 530 535 540

Cys Leu Pro Ile Asp Thr Leu Tyr Arg Asn Asn Thr Asp Leu Ile Asn
 545 550 555 560

Leu

- <210> 4
- <211> 508
- <212> PRT
- <213> mammarenavirus Pichindé

5

<400> 4

Met Gly Gln Val Val Thr Leu Ile Gln Ser Ile Pro Glu Val Leu Gln
 1 5 10 15

Glu Val Phe Asn Val Ala Leu Ile Ile Val Ser Thr Leu Cys Ile Ile
 20 25 30

Lys Gly Phe Val Asn Leu Met Arg Cys Gly Leu Phe Gln Leu Ile Thr
 35 40 45

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

Arg His Asn Leu Thr His Val Glu Phe Asn Leu Thr Arg Met Phe Asp
 65 70 75 80

Asn Leu Pro Gln Ser Cys Ser Lys Asn Asn Thr His His Tyr Tyr Lys
 85 90 95

Gly Pro Ser Asn Thr Thr Trp Gly Ile Glu Leu Thr Leu Thr Asn Thr
 100 105 110

Ser Ile Ala Asn Glu Thr Thr Gly Asn Phe Ser Asn Ile Arg Ser Leu
 115 120 125

Ala Tyr Gly Asn Ile Ser Asn Cys Asp Lys Thr Glu Glu Ala Gly His
 130 135 140

10

ES 2 746 150 T3

Thr Leu Lys Trp Leu Leu Asn Glu Leu His Phe Asn Val Leu His Val
 145 150 155 160

Thr Arg His Val Gly Ala Arg Cys Lys Thr Val Glu Gly Ala Gly Val
 165 170 175

Leu Ile Gln Tyr Asn Leu Thr Val Gly Asp Arg Gly Gly Glu Val Gly
 180 185 190

Arg His Leu Ile Ala Ser Leu Ala Gln Ile Ile Gly Asp Pro Lys Ile
 195 200 205

Ala Trp Val Gly Lys Cys Phe Asn Asn Cys Ser Gly Gly Ser Cys Arg
 210 215 220

Leu Thr Asn Cys Glu Gly Gly Thr His Tyr Asn Phe Leu Ile Ile Gln
 225 230 235 240

Asn Thr Thr Trp Glu Asn His Cys Thr Tyr Thr Pro Met Ala Thr Ile
 245 250 255

Arg Met Ala Leu Gln Lys Thr Ala Tyr Ser Ser Val Ser Arg Lys Leu
 260 265 270

Leu Gly Phe Phe Thr Trp Asp Leu Ser Asp Ser Thr Gly Gln His Val
 275 280 285

Pro Gly Gly Tyr Cys Leu Glu Gln Trp Ala Ile Val Trp Ala Gly Ile
 290 295 300

Lys Cys Phe Asp Asn Thr Val Met Ala Lys Cys Asn Lys Asp His Asn
 305 310 315 320

Glu Glu Phe Cys Asp Thr Met Arg Leu Phe Asp Phe Asn Gln Asn Ala
 325 330 335

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

Lys Thr Ile Asn Gly Leu Ile Ser Asp Ser Leu Val Ile Arg Asn Ser
 355 360 365

Leu Lys Gln Leu Ala Lys Ile Pro Tyr Cys Asn Tyr Thr Lys Phe Trp
 370 375 380

Tyr Ile Asn Asp Thr Ile Thr Gly Arg His Ser Leu Pro Gln Cys Trp

ES 2 746 150 T3

385		390		395		400
Leu Val His Asn Gly Ser Tyr Leu Asn Glu Thr His Phe Lys Asn Asp						
		405		410		415
Trp Leu Trp Glu Ser Gln Asn Leu Tyr Asn Glu Met Leu Ile Lys Glu						
		420		425		430
Tyr Glu Glu Arg Gln Gly Lys Thr Pro Leu Ala Leu Thr Asp Ile Cys						
		435		440		445
Phe Trp Ser Leu Val Phe Tyr Thr Ile Thr Val Phe Leu His Leu Val						
		450		455		460
Gly Ile Pro Thr His Arg His Ile Ile Gly Asp Gly Cys Pro Lys Pro						
		465		470		475
His Arg Ile Thr Arg Asn Ser Leu Cys Ser Cys Gly Tyr Tyr Lys Ile						
		485		490		495
Pro Lys Lys Pro Tyr Lys Trp Val Arg Leu Gly Lys						
		500		505		

<210> 5
 <211> 7057
 <212> ADN
 <213> mammarenavirus Pichindé

5

<400> 5

cgcaccgggg atcctaggca tctttgggtc acgcttcaaa tttgtccaat ttgaaccag	60
ctcaagtctt ggtcaaaact tgggatggga cttagatata gcaaagaggt caggaagaga	120
catggcgacg aagatgtggt gggaagggtc cccatgacct tcaatctacc acagggcctg	180
tatggcaggt tcaactgcaa atcttgctgg ttogtcaaca aaggtctcat caggtgcaaa	240
gaccactatc tgtgtcttgg gtgcttaacc aaaatgcact ccagaggcaa tctctgagag	300
atatgcggcc actcactgcc aaccaagatg gagttcctag aaagcccctc tgcaccaccc	360
tacgagccat aaaccagggc ccctgggcgc acccccctcc gggggtgcgc ccgggggccc	420
ccggcccat ggggccggtt gtttactcga tctccactga ctattgtcc tcaaacaact	480
ttcgacacct gattcccttg atcttgaagg gtctgtctc gtctgcaatc ataacagatc	540
ctagagtctt acttcttatt atactaaagt gaccacaatt caaccaatct ttggcatcat	600
gcaacatgtg ttcaaact tgggggaaat tttcaatcat gaggcttaa tctgtctcgt	660
tcatacttat tcccttgttg tgagactgtg cacttgaaag gtactgaaa aggttgcaaa	720
taaactcttg ccttttctca ggttctaagt cttccagtc aatgatgacc acctttgagt	780

10

ES 2 746 150 T3

ctaagttcac ttccaatcta gaaaccactc tgttgccctc tttgatcaac ccaccctcta 840
 aaatgagggg ttgcatccca acatcaggac caatcaactt ataggaaaat ttgtttttca 900
 aatccttgaa acgatttttc aaatctattc tcaccttctg gaacacagtt gaccttgact 960
 tgaagtgaat gtcttgacct tccaatagat cattgaagtc tagaacatct tttccggtga 1020
 tgagaggatt cagaacccaa agtgacacac catccagact tatgtgattc ccggaagatt 1080
 gagaaacata atactcaaca gaatgggggt tcaacaatag gtaaccatca gagtccaatg 1140
 agtccagcaa tgactccctt tcaataagaa atcttaattt taatatgtaa ttggtagacc 1200
 tctcatatct aaatttgtgg ctcaactctct tatgagaaaa tgttaggttg agctcaatgg 1260
 gaatgacctc agaaggtgat gctaaaatga gttgttcaat gttctcatag ttatctctat 1320
 tcaccagctc aagttcatta ataaatacac taatgttcaa attaacacag gacaaaatca 1380
 gtttgcctgc tacaagcca acatccaagt catccagatt cattgtccta gaagtgttat 1440
 tctttttgca gtcacaaatg aactgggtta attgtttcag atcatgttgt gcattgtttg 1500
 gcaacaattc aagctcacca aacccaaaat atttcttgaa ctgagatggt gacataatca 1560
 caggcaccaa cattgactca aacaaaatct gtatcaagaa atttgtgcac acttcttctg 1620
 gttcaaggtt gaatcctctc tccagtggat gagactctct gctatgggac attgcaagct 1680
 cattttgctt tacaatatac aattcttctc tgcgatgttt tataatatga ctaacaatac 1740
 caagacattc tgatgttata tcaattgcca cacaaaggtc taagaacttt atcctctgaa 1800
 cccatgatag cctcagcata ttcaaactag acaggaaagg ggatatgtgt tcatcaaata 1860
 gtgtagggaa gttcctcctg attgagtaaa gtatgtgggt gatgccacc ttgtcctcaa 1920
 gctcagaatg tgtgcttggg tttattggcc agaagtgatt gggattgttt aggtgagtga 1980
 ctatcttggg tacttcagct ttttgaaaca cccagttacc caactcgcaa gcattggtta 2040
 acacaagagc aaaataatcc caaattaagg gtctggagta ctcaactact tcaccaagtg 2100
 ctgctttaca ataaacacct ttgcgctgat taaaaagtg acaatcacgg tgtaagataa 2160
 tcttgcttgt aatatccctg atatacttaa atcctccttt cccgtctctt acacattttg 2220
 agcccatact tttgcaaact cctatgaatc ctgatgctat gctgctctga aaagctgatt 2280
 tgttgatagc atcagccaaa atcttcttag cccctctgac atagttcttt gataatttgg 2340
 actgtacgga tttgacaaga ctgggtatth cttctcgctg cacagttctt gttgtgctca 2400
 ttaacttagt acgaagcacc aatctgagat caccatgaac ccttaaattt aaccacctaa 2460
 tattaagagc atcctcaata gcctcagtct cgacatcaca agtctctaata aactgtttta 2520
 agcagtcacg cggtgattgc tgaagagttg ttacaatata actttcttcc agggctccag 2580
 actgtattht gtaaaatatt ttctgcatg cctttctgat tattgaaagt agcagatcat 2640
 caggaaatag tgtctcaatt gatcgctgaa gtctgtaccc tctcgacca ttaaccaat 2700

ES 2 746 150 T3

cgagtacatc catttcttcc aggcacaaaa atggatcatt tggaaaccca ctatagatta 2760
 tcatgctatt tgttcgtttt gcaatggccc ctacaacctc tattgacacc ccgttagcaa 2820
 cacattggtc cagtattgtg tcaattgtat ctgcttgctg attgggtgct ttagccttta 2880
 tgttgtagtag agctgcagca acaaactttg taaggagggg gacttcttgt gaccaaata 2940
 agaatctcga tttgaactca cttgcaaag tccccacaac tgttttaggg ctcaaaaact 3000
 tgttgagttt gtctgataga aagtagtgaa actccataca gtccaatacc aattcaacat 3060
 tcaactcatc tctgtcctta aatttgaaac cctcattcaa ggataacatg atctcatcat 3120
 cactogaagt atatgagatg aaccgtgctc cataacaaag ctccaatgcg taattgatga 3180
 actgctcagt gattagacca tataagtcag aggtggtgtg taggatgccc tgaccatata 3240
 ctaagactga agagatgtgt gatggtacct tgccttctc aaagtaccca aacataaatt 3300
 cctctgcaat tgtgcacccc cctttatcca tcatacccaa ccccttttc aagaaacctt 3360
 tcatgtatgc ctcaacgaca ttgaagggca cttccacat cttgtgaatg tgccatagca 3420
 atatggtgat gactgcagca ttgggaactt ctgaccatc tttgagtttg aactcaagac 3480
 cttttaataa tgcggcaaag ataaccggcg acatgtgtgg ccccatctt gaatggtcca 3540
 ttgacaccgc aagaccactt tgcctaacaa ctgacttcat gtctaataat gctctctcaa 3600
 actctttctc gttgttcaga caagtatacc tcatgttttg cataagggat tcagagtaat 3660
 cctcaatgag tctggttggt agtttagtat ttaaatcacc gacataaagc tcctgttgc 3720
 caccacactg ttctttataa gaaagaccaa atttcaatct ccctacattg gtggatacac 3780
 cagacctctc tgtgggagac tcatctgaat agaaacagag atttcgtaag gatgagttgg 3840
 taaaaaagct ttgatccaat cttttagcta tcgattcaga attgctctct cttgagctta 3900
 tacgtgatgt ctctctaatt tgtagtgtg catctgtgaa cccaagtctg cttctacttt 3960
 tgtgatcata tcttccgact cgattatcat aatcgcttg aatgagaatg tatttaaagc 4020
 actcaaaata atcagcttct ttgtacgct tcaatgtgag gttctttatt aaaaactcca 4080
 gaggacacgg attcattagt ctgtctgcaa agtacactga tctagcagtg acatcctcat 4140
 agatcaagtt tacaagatcc tcatacactt ctgctgaaaa caggctgtaa tcaaaatcct 4200
 ttacatcatg aagtgaagtc tctcttttga tgacaacat tgtcgatttg ggccataatc 4260
 tctctagtgg acatgaagtc ttaagggttg ttttgacatt ggtgtcaacc ttagacaata 4320
 cttttgcaac tctggtctca atttctttaa gacagtcacc ctgatcttct gatagtaact 4380
 cttcaactcc atcaggctct attgactcct tttttatttg gatcaatgat gacaacctct 4440
 tcagaatctt gaaatttacc tcctttggat ccaacttgta tttaccctta gttttgaaat 4500
 gttcaatcat ttccacaaca acagcagaca caatggaaga gtaatcatat tcagtgatga 4560

ES 2 746 150 T3

cctcaccaac ttcattgagt tttggaacca ccacactttt gttgctggac atatccaagg 4620
 ctgtacttgt gaaggagggg gtcatagggt cacaaggaag caggggtttc acttccaatg 4680
 agctactggt aaatagtgat agacaaacac taagtacatc cttattcaac cccggccttc 4740
 cctcacattt ggattccagc tttttaccaa gtagtctctc tatatcatgc accatcttct 4800
 cttcttcctc agtaggaagt tccatactat tagaagggtt gaccaagact gaatcaaact 4860
 ttaactttgg ttccaagaac ttctcaaac atttgatttg atcagttaat ctatcagggg 4920
 tttctttggg tataaaatgg cataaatagg agacattcaa aacaaactta aagatcttag 4980
 ccatatcttc ctctctggag ttgctgagta ccagaagtat caaatcatca ataagcattg 5040
 ctgtctgcc a ttctgaaggt gttagcataa cgactttcaa tttctcaaac aattctttaa 5100
 aatgaacttc atttacaaag gccataatgt aatatctaaa gccttgcaag taaacttgaa 5160
 tacgcttggg aggggtgcac agtatgcaga gaataagtcg tctgagtaaa tcagaaacag 5220
 aatccaagag gggttgggac ataaagtcca accaggataa catctccaca caagtccttt 5280
 gaatcacatc tgcactaaag atcggtaaga aaaatctctt gggatcacag taaaaagacg 5340
 cttttgtttc atacaaacc ccacttttgg atctataagc aacagcataa cacctggacc 5400
 tctcccctgt cttctggtac agtagtgtga gagaacctcc ttctccaaat cgctggaaga 5460
 aaacttgcgc acagtaaacc ttcccataaa actcatcagc attgttcacc ttcatcttag 5520
 gaactgctgc tgtcttcatg ctattaatga gtgacaaact caaacttgac aatgttttca 5580
 gcaattcctc aaactcactt tgcgccatga tggataatc aggctgccct cttcctggcc 5640
 taccocacac catacactgt gactttgtct tgtattgaag acagggttta gcacccatt 5700
 catctaacac tgatgttttc agattgaagt aatattcaac atcaggttcc cgtagaagag 5760
 ggagaatgtc atcaagggga agttcaccac agaccgagct cagtctcttc ttagccttct 5820
 ctaaccagtt ggggttttta atgaattttt tagtgatttg ttccatcagg aagtcgacat 5880
 taatcaacct gtcatttaca gacggtaacc cttgcattag gagcacctct ctgaacacag 5940
 cacctggaga agacttgtcc aagtcacaca aaatgttgta catgataagg tccagaacca 6000
 acatggtggt cctccttgtg ttaaaaacct tttgagactt aattttgttg catattgaaa 6060
 gtactctaaa atattctctg ctttcagttg atgaatgctt gacctcagat tgctgagtt 6120
 ggctattat gcccaaatg tgtactgagc aaaactcaca taatctgatt tctgatttag 6180
 gtacatcttt gacagaacat tggataaatt catggttctg aagtctagaa atcatatctt 6240
 ccctatctgt agcctgcagt ttccatcga gttgaccagc aagttgcaac attttaaatt 6300
 gctgaaagat ttccatgatt tttgttctac attgatctgt tgtcagttta ttattaatgc 6360
 cagacattaa tgccttttcc aacctcactt tgtaaggaag tcccctttcc tttacagcaa 6420
 gtagtgactc cagaccgaga ctctgatttt ctaaggatga gagggaactt ataaggcgtt 6480

ES 2 746 150 T3

cgtactccaa ctctcaact tcttcaccag atgtccttaa tccatccatg agttttaaaa 6540
 gcaaccaccg aagtctctct accacccaat caggaacaaa ttctacataa taactggatc 6600
 taccgtcaat aacaggtact aaggttatgt tctgtctctt gagatcagaa ctaagctgca 6660
 acagcttcaa aaagtctgg ttgtatttct tctcaaatgc ttcttgactg gtcctcacia 6720
 acacttcaa aagaatgagg acatctcaa ccatacagta accatctggt gtaacatccg 6780
 gcaatgtagg acatgttact ctcaactccc taaggatagc attgacagtc atcttttgtt 6840
 tgtgtttgca ggagtgtttc ttgcatgaat ccacttccac tagcatggac aaaagcttca 6900
 ggcctctat cgtgatggcc ctatctttga cttgtgcaag aacgttgttt ttctgttcag 6960
 atagctcttc ccattcggga acccattttc tgactatgtc ttttaagttcg aaaacgtatt 7020
 cctccatgat caagaaatgc ctaggatcct cgggtgcg 7057

<210> 6
 <211> 3421
 <212> ADN
 <213> mammarenavirus Pichindé

 <400> 6

5

cgcaccgggg atcctaggca taccttgac gcgcatatta cttgatcaaa gatgggacaa 60
 gttgtgactt tgatccagtc tatacccgaa gtctgcagg aggtcttcaa tgtcgcctta 120
 atcattgtct caaccctatg catcatcaaa ggatttgtca atctgatgag atgtggccta 180
 ttccaactca tcaccttctt cttttggct ggcagaagt gtgatggcat gatgattgat 240
 aggaggcaca atctcaccca cgttgagttc aacctcacia gaatgtttga caacttgcca 300
 caatcatgta gcaagaacia cacacatcat tactaciaag gaccatctaa cacaacatgg 360
 ggaattgaac tcactttgac aacacatcc attgcaaatg aaactactgg aaacttttcc 420
 aacatcagaa gccttgcata tggtaacatt agtaattgtg ataagacaga agaagcaggt 480
 cacacattaa aatggttgct taatgagtta cacttcaatg tgctccatgt cactcgtcat 540
 gtaggtgcca gatgcaaac agttgaggtg gctgggtgtg tgatccagta caacttgaca 600
 gttggggata gaggaggtga ggttggcaga catcttattg cgtcgttgc tcaaatcatt 660
 gggaccacia aaattgcgtg ggttgaaaa tgtttcaata actgtagtgg aggtcttgc 720
 agactaacia actgtgaagg tgggacacat tacaatttcc tgatcataca gaacaccaca 780
 tgggaaatc actgtacata tactccaatg gcaacaataa ggatggctct ccaaaaaact 840
 gcttatagtt ctgtgagcag gaaactcctt ggctttttca cttgggactt gagtgactct 900
 actgggcaac atgtcccagg tggttactgt ttggagcaat gggctattgt ttgggctgga 960
 ataaaatgtt ttgataacac tgtgatggca aaatgcaaca aagatcacia tgaagaattt 1020
 tgcgatacga tgaggttatt tgatttcaat cagaatgcta tcaaacctt acaacttaat 1080

10

ES 2 746 150 T3

gttgagaatt cgttgaatct ctttaaaaag actatcaacg gacttatttc tgactcactt 1140
 gtgattagaa acagtctcaa acagcttgcc aaaatccctt attgcaacta tacaaaattt 1200
 tggtagatca atgataccat cacaggaaga cattctttac cgcagtgttg gttagttcac 1260
 aatggctcgt acctcaatga aacgcatttt aagaatgatt ggttgtggga gagccagaat 1320
 ctgtacaatg aaatgctgat aaaagaatat gaagaaagac aaghtaagac tccactagca 1380
 ttgacagaca tttgcttctg gtctttgggt ttttacacca tcacagtgtt tctccactta 1440
 gttggaatac ccactcatag gcacatcatt ggtgatggct gtccgaagcc acataggatt 1500
 actaggaact ctctttgcag ctgtgggtat tataaaatcc caaagaaacc ctacaaatgg 1560
 gtgagactgg gtaaataaagc cctagcctcg acatgggctc cgacgtcact ccccaatagg 1620
 ggagtgacgt cgaggcctct gaggacttga gctcagaggt tgatcagatc tgtgttgttc 1680
 ctgtacagcg tgtcaatagg caagcatctc atcggcttct ggtccctaac ccagcctgtc 1740
 actgttgcat caaacatgat ggtatcaagc aatgcacagt gaggattcgc agtggtttgt 1800
 gcagccccct tcttcttctt ctttatgacc aaacctttat gtttggtgca gagtagattg 1860
 tatctctccc agatctcatc ctcaaagggt cgtgcttgct cggcactgag tttcacgtca 1920
 agcactttta agtctcttct cccatgcatt tcgaacaaac tgattatata atctgaacct 1980
 tgagcagtga aaacctatgt ttgaggtaaa tgtctgatga ttgaggaaat caggcctggt 2040
 tgggcatcag ccaagtcctt taaaagaaga ccatgtgagt acttgctttg ctctttgaag 2100
 gacttctcat cgtggggaaa tctgtaacaa tgtatgtagt tgcccgtgtc aggctggtag 2160
 atggccattt ccaccggatc atttgggtgt ccttcaatgt caatccatgt ggtagctttt 2220
 gaatcaagca tctgaattga ggacacaaca gtgtcttctt tctccttagg gatttgttta 2280
 aggtccggtg atcctccggt tcttactggt ggctggatag cactcggctt cgaatctaaa 2340
 tctacagtgg tgttatccca agccctccct tgaacttgag accttgagcc aatgtaaggc 2400
 caacctccc ctgaaagaca aatcttgtat agtaaatttt cataaggatt tctctgtccg 2460
 ggtgtagtgc tcacaaacat accttcacga ttctttattt gcaatagact ctttatgaga 2520
 gtactaaaca tagaaggctt cacctggatg gtctcaagca tattgccacc atcaatcatg 2580
 caagcagctg ctttgactgc tgcagacaaa ctgagattgt accctgagat gtttatggct 2640
 gatggctcat tactaatgat ttttagggca ctgtgttgct gtgtgagttt ctctagatct 2700
 gtcatgttcg ggaacttgac agtgtagagc aaaccaagtg cactcagcgc ttggacaaca 2760
 tcatlaagtt gttcaccctt ttgctcagtc atacaagcga tgghtaaggc tggcattgat 2820
 ccaaattgat tgatcaacaa tgtattatcc ttgatgtccc agatcttcac aacctcatct 2880
 ctgttgctg tgggtctagc attagcgaac cccattgagc gaaggatttc ggctctttgt 2940

ES 2 746 150 T3

	tccaactgag tgtttgtgag attgccccca taaacaccag gctgagacaa actctcagtt	3000
	ctagtgactt tctttcttaa cttgtccaaa tcagatgcaa gctccattag ctcctctttg	3060
	gctaagcctc ccaccttaag cacattgtcc ctctggattg atctcatatt catcagagca	3120
	tcaacctctt tgttcatgtc tcttaacttg gtcagatcag aatcagtcct tttatctttg	3180
	cgcatcattc tttgaacttg agcaactttg tgaagtcaa gagcagataa cagtgtcttt	3240
	gtgtccgaca acacatcagc cttcacagga tgggtccagt tggatagacc ctcctaagg	3300
	gactgtacct agcggaatga tgggatgttg tcagacattt tggggttggt tgcacttctt	3360
	ccgagtcagt gaagaagtga acgtacagcg tgatctagaa tcgcctagga tccactgtgc	3420
	g	3421
5	<210> 7 <211> 9 <212> PRT <213> epitopo de nucleoproteína	
	<400> 7	
10	Ala Ser Asn Glu Asn Met Glu Thr Met 1 5	
15	<210> 8 <211> 84 <212> ARN <213> mammarenavirus Pichindé	
	<400> 8	
20	cgcacccgggg auccuaggca ucuuuggguc acgcuucaaa uuuguccaau uugaaccag	60
	cucaaguccu ggucaaaacu uggg	84
25	<210> 9 <211> 30 <212> ARN <213> mammarenavirus Pichindé	
	<400> 9 cgcacggagg auccuaggca uuucuugauc 30	
30	<210> 10 <211> 51 <212> ARN <213> mammarenavirus Pichindé	
35	<400> 10 cgcacccgggg auccuaggca uaccuuggac gcgcgauuuu cuugaucaaa g 51	
40	<210> 11 <211> 83 <212> ARN <213> mammarenavirus Pichindé	
	<400> 11	
45	cgcacagugg auccuaggcg auucuagauc acgcuguacg uucacuucuu cacugacucg	60
	gaggaagugc aaacaacccc aaa	83
	<210> 12	

ES 2 746 150 T3

	<211> 71		
	<212> ARN		
	<213> mammarenavirus Pichindé		
5	<400> 12		
	accagggccc cugggcgcac ccccuccgg gggugcgccc gggggcccc ggccccaugg	60	
	ggccgguugu u	71	
10	<210> 13		
	<211> 75		
	<212> ARN		
	<213> mammarenavirus Pichindé		
15	<400> 13		
	gcccuagccu cgacauggc cucgacguca cccccaaaua ggggagugac gucgaggccu	60	
	cugaggacuu gagcu	75	
20	<210> 14		
	<211> 87		
	<212> ADN		
	<213> ribozima del virus de la hepatitis delta		
	<400> 14		
	agctctccct tagccatccg agtggacgac gtcctccttc ggatgccag gtcggaccgc	60	
25	gaggaggtgg agatgcatg ccgaccc	87	

REIVINDICACIONES

1. Un virus Pichindé modificado por ingeniería genética, que comprende:
tres segmentos genómicos ambisentido,

5 en donde el primer segmento genómico comprende una región codificante que codifica una proteína Z y una región codificante que codifica una proteína RdRp L, en donde el segundo segmento genómico comprende una región codificante que codifica una nucleoproteína (NP) y un primer sitio de enzima de restricción, y
10 en donde el tercer segmento genómico comprende una región codificante que codifica una glucoproteína y un segundo sitio de enzima de restricción; y en donde la proteína NP comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 80 % con la SEQ ID NO: 3.

15 2. El virus de la reivindicación 1, en donde (i) el segundo segmento genómico comprende un sitio de clonación múltiple, y en donde el primer sitio de enzima de restricción es parte del sitio de clonación múltiple; y/o (ii) el tercer segmento genómico comprende un sitio de clonación múltiple, y en donde el segundo sitio de enzima de restricción es parte del sitio de clonación múltiple.

20 3. El virus de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde (iii) el segundo segmento genómico comprende adicionalmente una región codificante que codifica una primera proteína insertada en el primer sitio de restricción; y/o (iv) en donde el tercer segmento genómico comprende adicionalmente una región codificante que codifica una segunda proteína insertada en el segundo sitio de restricción.

25 4. El virus de la reivindicación 3, en donde la primera proteína y la segunda proteína se seleccionan de un antígeno y un marcador de detección, preferentemente en donde el antígeno es una proteína expresada por un patógeno vírico, un patógeno procariota o un patógeno eucariota, o un fragmento del mismo que puede suscitar una respuesta inmunitaria en un sujeto.

30 5. El virus de la reivindicación 4, en donde el patógeno vírico se selecciona del grupo que consiste en miembros de la familia *Rhabdoviridae*, incluyendo el virus de la estomatitis vesicular VSV, miembros del género *Aphthovirus*, incluyendo el virus de la fiebre aftosa VFA, miembros del género *Pestivirus*, incluyendo el virus de la diarrea vírica bovina, miembros de la familia *Arterivirus*, incluyendo el virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino VSRRP, *Coronaviruses*, incluyendo el virus de la diarrea epidémica porcina VDEP, CoVSRA, CoVSRM, miembros del género *Torovirus*, incluyendo el torovirus equino, miembros de la familia *Orthomyxoviridae*, incluyendo el virus de la gripe, miembros de la familia *Reoviridae*, incluyendo los rotavirus, el virus de la enfermedad de la lengua azul, reovirus aviares, miembros de la familia de los circovirus, miembros de la familia *Herpesviridae*, miembros de la familia *Retroviridae*, incluyendo VIH, VIF, VIS, VLA, VLB, VRS, miembros de la familia *Asfarviridae*, incluyendo el virus de la peste porcina africana, miembros del género *Flavivirus*, incluyendo el virus del dengue, virus de la fiebre amarilla, miembros de la familia *Paramyxoviridae*, incluyendo el virus de la enfermedad de Newcastle y el virus respiratorio sincicial VRS, miembros del género de los arnavirus, incluyendo miembros del complejo de los virus VCML-Lassa (Viejo Mundo) y el complejo del virus Tacaribe (Nuevo Mundo), virus de la coriomeningitis linfocítica, virus Pichindé, virus de Lassa, virus Mopeia, virus Junín, virus Guanarito, virus Lujo, virus Machupo, virus Sabiá y virus Whitewater Arroyo.

45 6. El virus de la reivindicación 4, en donde el patógeno procariota es un patógeno gramnegativo o un patógeno grampositivo, en donde el patógeno gramnegativo se selecciona del grupo que consiste en miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, incluyendo miembros de la familia *Enterobacteriaceae* que son miembros de la tribu *Escherichieae* o *Salmonelleae*, miembros de la familia *Vibrionaceae*, incluyendo *Vibrio cholerae*, *Campylobacter* spp., incluyendo *C. jejuni*, *E. coli*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Proteus* spp., *Klebsiella* spp., por ejemplo, *K. pneumoniae*, *Serratia* spp., *Yersinia* spp, incluyendo *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica*, miembros de la familia *Pasteurellaceae*, preferentemente *Pasteurella* spp., tal como *P. multocida* y *Mannheimia haemolytica*, miembros de la familia *Pseudomonadaceae*, tal como *Pseudomonas* spp., incluyendo *P. aeruginosa*, *Bordetella* spp., *Burkholderia* spp., *Chlamydia* spp., *Enterobacter* spp., *Helobacter* spp., *Histophilus* spp., *Moraxella* spp., *Legionella* spp., *Leptospirillum* spp., *Rickettsia* spp., *Treponema* spp., *Neisseria* spp., *Actinobacillus* spp., *Haemophilus* spp., *Mycobacterium* spp., *Sporocytophaga* spp., *Chondrococcus* spp., *Cytophaga* spp., *Flexibacter* spp., *Flavobacterium* spp., *Aeromonas* spp., *Fusobacterium* spp., que pertenecen a la familia *Fusobacteriaceae*, incluyendo *F. necrophorum*, *F. necrophorum* subsp. *Necrophorum*, *F. necrophorum* subsp. *funduliforme*, *F. nucleatum*, *F. canifelinum*, *F. gonidiaformans*, *F. mortiferum*, *F. naviforme*, *F. necrogenes*, *F. russii*, *F. ulcerans* y *F. variu*,

60 o en donde el patógeno grampositivo se selecciona del grupo que consiste en miembros de la familia *Micrococcaceae*, incluyendo *Staphylococcus* spp., tal como *S. aureus*, miembros de la familia *Deinococcaceae*, tal como *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equi*, *Streptococcus zooepidemicus* y *Streptococcus dysgalactiae*, *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., *Corynebacterium* spp., *Erysipelothrix* spp., *Listeria* spp., *Mycobacterium* spp., miembros de las *Corynebacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Micrococcaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Nocardiaceae* y *Peptococcaceae*, que incluyen *Actinomyces* spp., *Bifidobacterium* spp., *Enterococcus* spp.,
65 *Eubacterium* spp., *Kytococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Micrococcus* spp., *Mobiluncus* spp., *Mycobacteria* spp.,

Peptostreptococcus spp. y *Propionibacterium* spp., *Gardnerella* spp., *Mycoplasma*., *Nocardia* spp., *Streptomyces* spp., *Borrelia* spp. y *Bacillus* spp.,

o en donde el patógeno eucariota es un protozoo patógeno que incluye protozoos intestinales, protozoos urogenitales, protozoos sistémicos y protozoos extraintestinales, por ejemplo, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, *Cystoisospora belli*, *Cyclospora cayetanensis*, miembros del filo *Microsporidia*, *Trichomonas vaginalis*, *Plamodium falciparum*, *Toxoplasma gondii*, miembros de la subclase *Coccidiosis*, tal como miembros del género *Eimeria*, incluyendo *E. acervulina*., *E. necatrix* y *E. tenella*, nematodos, trematodos y cestodos.

7. El virus de la reivindicación 6, en donde la cepa de *E. coli* se selecciona del grupo que consiste en los serotipos de *E. coli* O1a, O2a, O78 y O157, serotipos O:H que incluyen O104, O111, O26, O113, O91, cepas hemolíticas de *E. coli* enterotoxigénica, tales como K88+, F4+, F18ab+ y F18ac+, y cepas no hemolíticas tales como 987P, F41 y K99, o en donde la *E. coli* es una *E. coli* diarregénica seleccionada del grupo que consiste en cepas enteropatógenas, enterohemorrágicas, enterotoxigénicas, enteroinvasoras y enteroagregativas.

8. El virus de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la nucleoproteína comprende al menos una mutación que reduce la actividad exorribonucleasa de la nucleoproteína, en donde la mutación se selecciona de un ácido aspártico en una posición correspondiente al aminoácido 380 de la SEQ ID NO: 3, un ácido glutámico en una posición correspondiente al aminoácido 382 de la SEQ ID NO: 3, un ácido aspártico en una posición correspondiente al aminoácido 525 de la SEQ ID NO: 3, una histidina en una posición correspondiente al aminoácido 520 de la SEQ ID NO: 3, y un ácido aspártico en una posición correspondiente al aminoácido 457 de la SEQ ID NO: 3, en donde el ácido aspártico, el ácido glutámico o la histidina se sustituye por cualquier otro aminoácido; y/o en donde la glucoproteína comprende al menos una mutación, en donde la mutación se selecciona de una asparagina en una posición correspondiente al aminoácido 20 de la SEQ ID NO: 4 y una asparagina en una posición correspondiente al aminoácido 404 de la SEQ ID NO: 4, y en donde la asparagina se sustituye por cualquier otro aminoácido.

9. Una partícula de virus Pichindé infecciosa que comprende los tres segmentos genómicos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

10. Una composición que comprende la partícula de virus Pichindé infecciosa aislada de la reivindicación 9.

11. Una colección de vectores que comprende:

un primer vector que codifica un primer segmento genómico que comprende una región codificante que codifica una proteína Z y una región codificante que codifica una proteína RdRp L, en donde el primer segmento genómico es antígenómico,

un segundo vector que codifica un segundo segmento genómico que comprende una región codificante que codifica una nucleoproteína (NP) y un primer sitio de enzima de restricción, en donde el segundo segmento genómico es antígenómico, y

un tercer vector que codifica un tercer segmento genómico comprende una región codificante que codifica una glucoproteína y un segundo sitio de enzima de restricción, en donde el tercer segmento genómico es antígenómico; y

en donde la proteína NP comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 80 % con la SEQ ID NO: 3.

12. La colección de la reivindicación 11, en donde los vectores son plásmidos, opcionalmente en donde los plásmidos comprenden adicionalmente un promotor T7.

13. La colección de la reivindicación 11 o la reivindicación 12, en donde el segundo segmento genómico, el tercer segmento genómico, la primera proteína o la segunda proteína son como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7.

14. Un método para fabricar un virus Pichindé modificado por ingeniería genética que comprende:

introducir en una célula la colección de vectores de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13; e incubar las células en un medio en condiciones adecuadas para la expresión y el empaquetamiento del primer, segundo y tercer segmentos genómicos, opcionalmente, que comprende adicionalmente aislar del medio una partícula de virus infecciosa.

15. El método de la reivindicación 14, en donde las células expresan una polimerasa T7.

16. Un sistema de genética inversa para fabricar un virus Pichindé modificado por ingeniería genética que comprende la colección de vectores de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13.

17. La colección de vectores de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, para su uso en un método de tratamiento del cáncer o de una infección por un virus o un microbio, comprendiendo dicho método: introducir dichos vectores en una célula; incubar la célula en condiciones adecuadas para la transcripción de los tres segmentos

genómicos y la expresión de las regiones codificantes de cada segmento genómico.

5 18. La colección de vectores para su uso de acuerdo con la reivindicación 17, en donde la introducción comprende transfectar una célula con los tres segmentos genómicos o comprende poner en contacto la célula con una partícula de virus infecciosa que comprende los tres segmentos genómicos; y/o en donde la célula es una célula de vertebrado, preferentemente una célula de mamífero o una célula aviar, más preferentemente, en donde la célula de mamífero es una célula humana o en donde la célula aviar es un fibroblasto embrionario de pollo.

10 19. Un método para utilizar un sistema de genética inversa, que comprende:

15 introducir en una célula *ex vivo* la colección de vectores de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13; incubar la célula en condiciones adecuadas para la transcripción de los tres segmentos genómicos y la expresión de las regiones codificantes de cada segmento genómico, opcionalmente, que comprende adicionalmente aislar partículas de virus infecciosas producidas por la célula, en donde cada partícula de virus infecciosa comprende los tres segmentos genómicos.

20 20. El método de la reivindicación 19, en donde la introducción comprende transfectar una célula con los tres segmentos genómicos o comprende poner en contacto la célula con una partícula de virus infecciosa que comprende los tres segmentos genómicos; y/o en donde la célula es una célula de vertebrado, preferentemente una célula de mamífero o una célula aviar, más preferentemente, en donde la célula de mamífero es una célula humana o en donde la célula aviar es un fibroblasto embrionario de pollo.

25 21. La partícula de virus Pichindé infecciosa de la reivindicación 9, en donde el segundo segmento genómico comprende adicionalmente una región codificante que codifica un primer antígeno insertado en el primer sitio de restricción, y el tercer segmento genómico comprende adicionalmente una región codificante que codifica un segundo antígeno insertado en el segundo sitio de restricción, para su uso en un método de producción de una respuesta inmunitaria en un sujeto, que comprende administrar dicha partícula a un sujeto.

30 22. La partícula de virus para el uso de la reivindicación 21, en donde el sujeto es un vertebrado, preferentemente, en donde el vertebrado es un mamífero o un ave, más preferentemente en donde el mamífero es un ser humano.

35 23. La partícula de virus para el uso de la reivindicación 21 o la reivindicación 22, en donde el antígeno es una proteína expresada por un patógeno vírico, un patógeno procariota o un patógeno eucariota, o un fragmento del mismo que puede suscitar una respuesta inmunitaria en un sujeto, y en donde el sujeto está en riesgo de exposición al patógeno vírico, el patógeno procariota o el patógeno eucariota; y/o en donde la administración comprende administrar al menos dos poblaciones de partículas de virus infecciosas, en donde cada población de partículas de virus infecciosas codifica un antígeno distinto.

Fig. 1

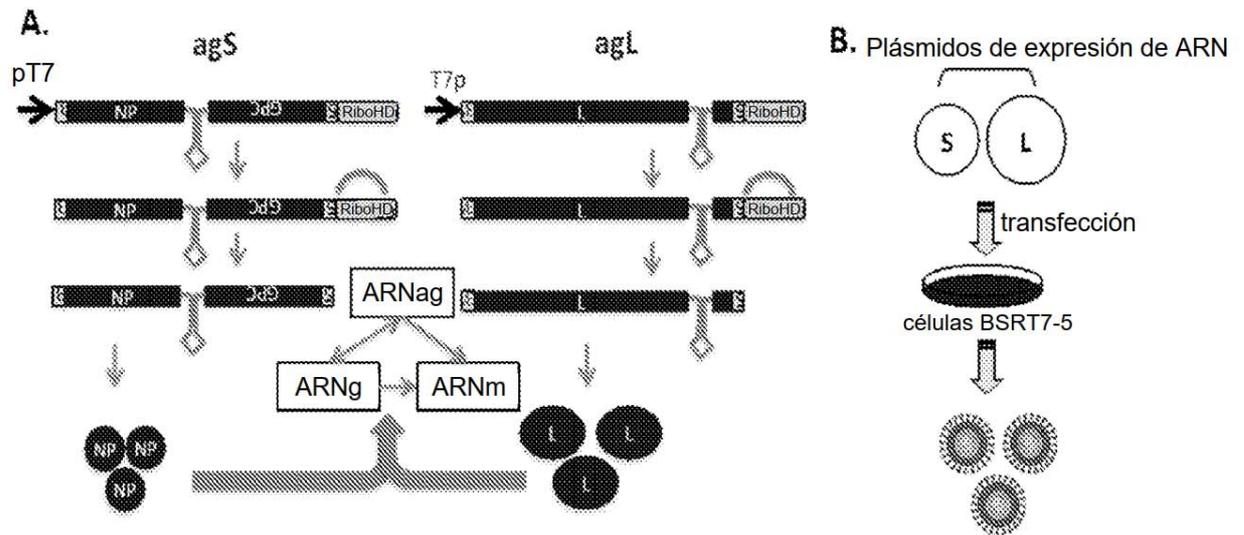


Fig. 2

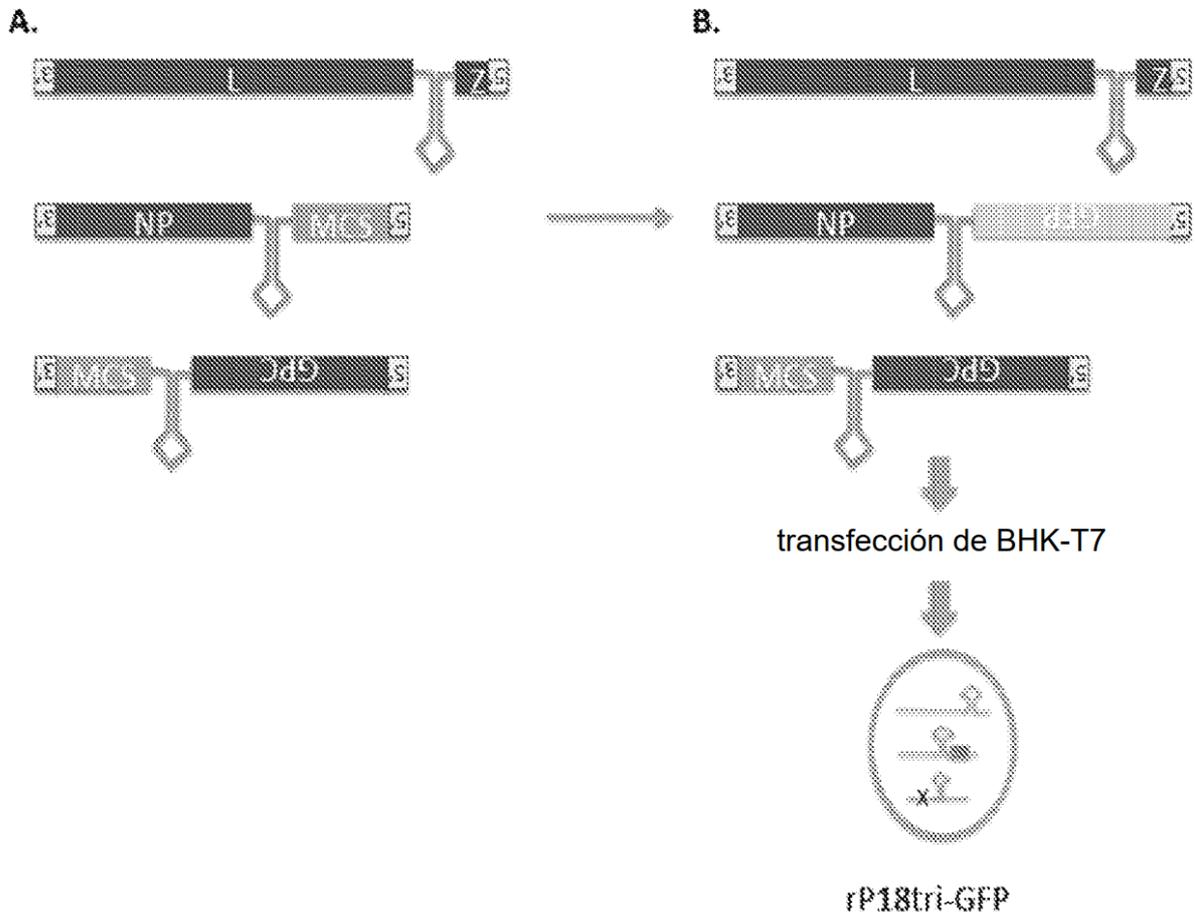
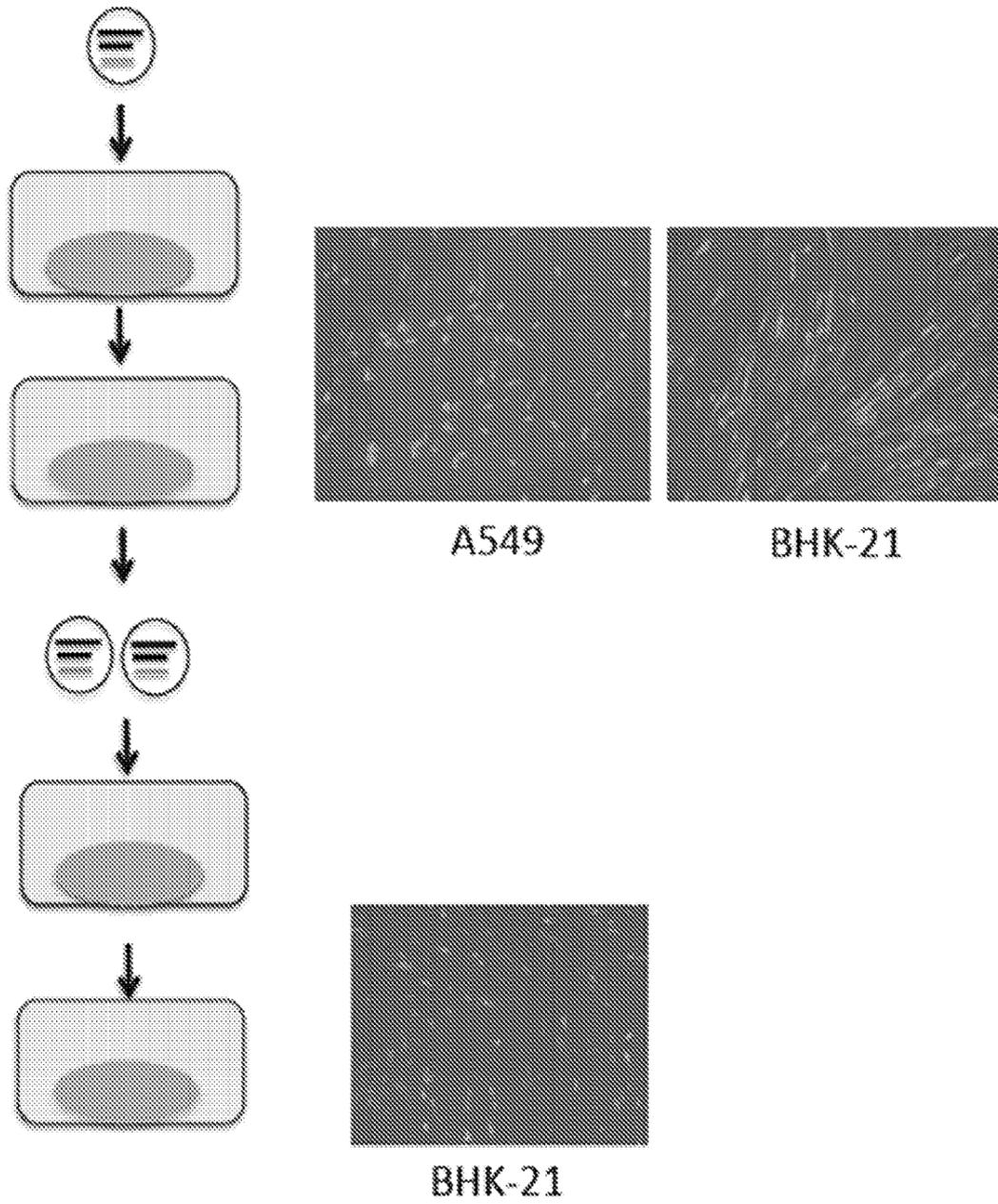


Fig. 3



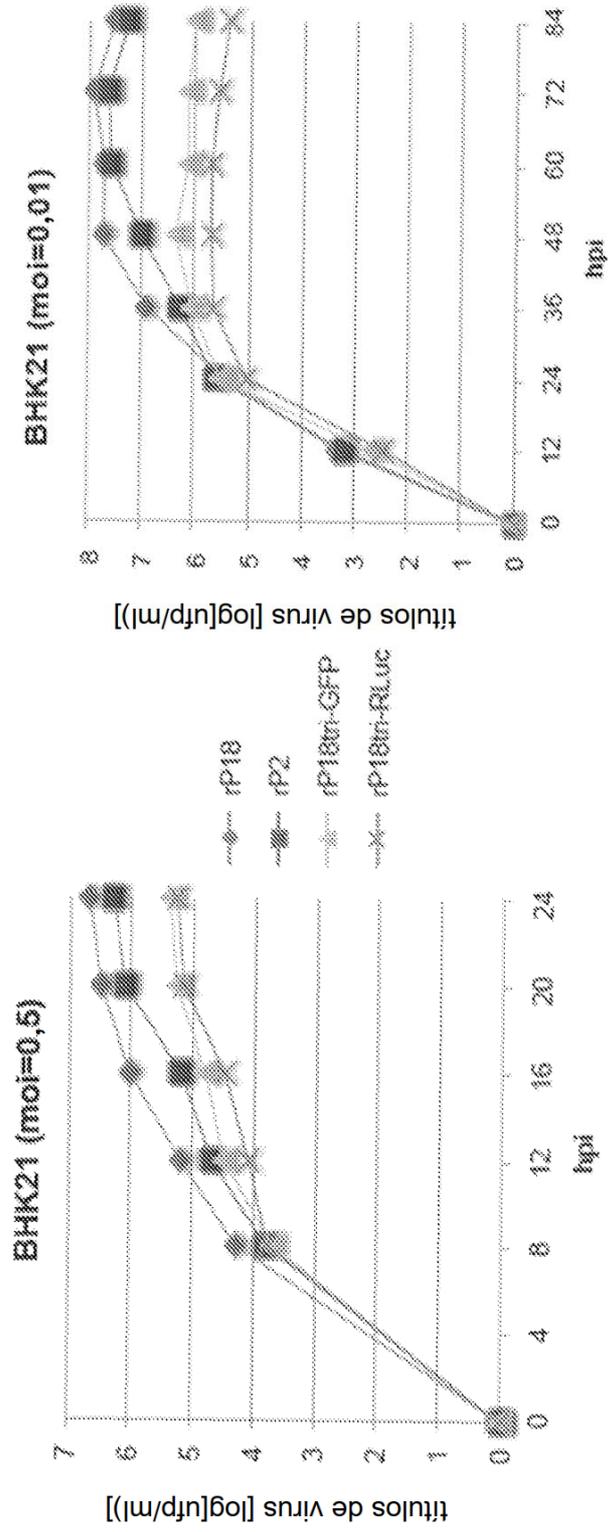


Fig. 4

Fig. 5

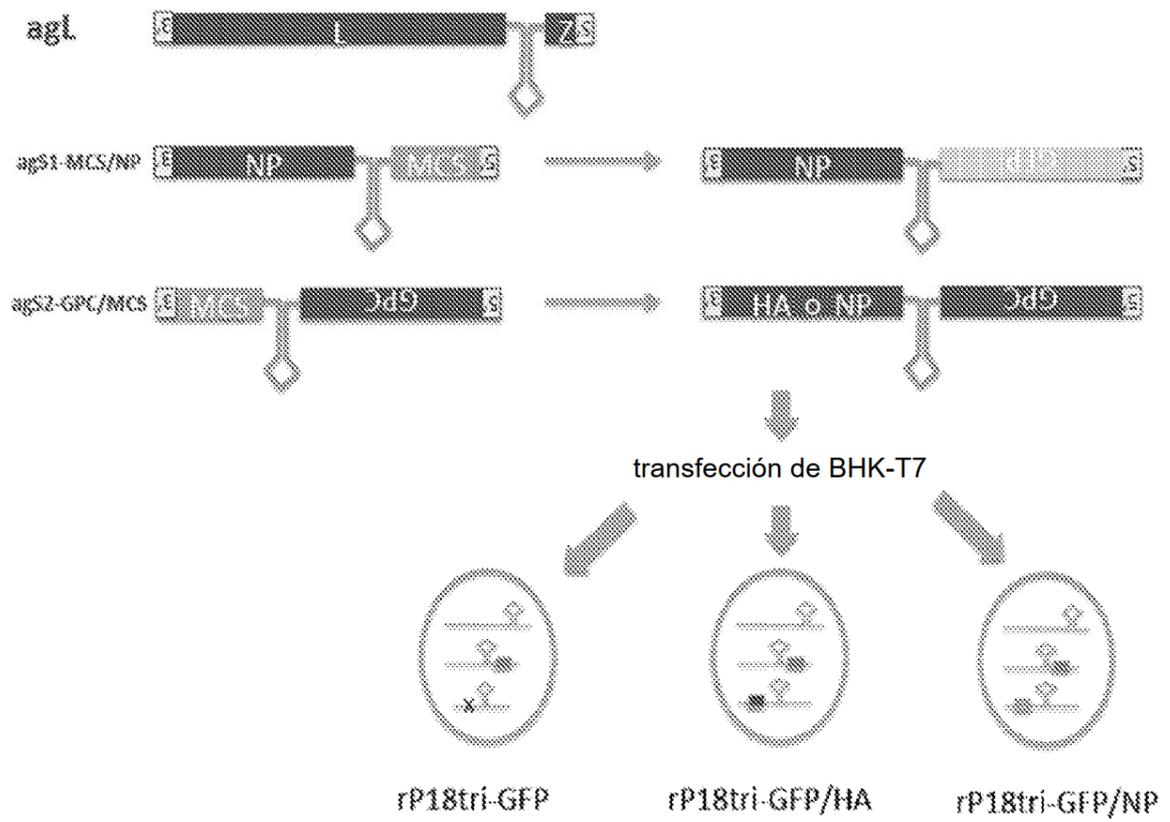


Fig. 6

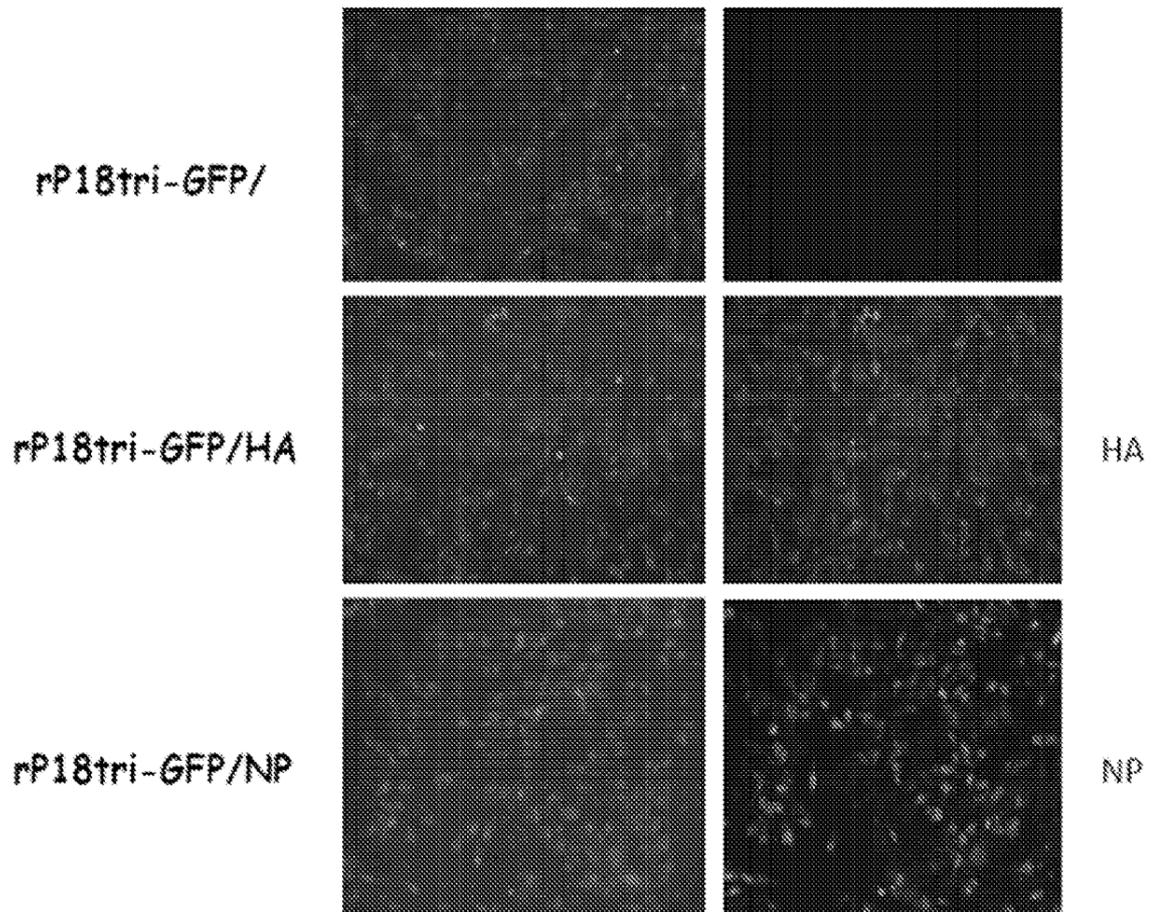


Fig. 7

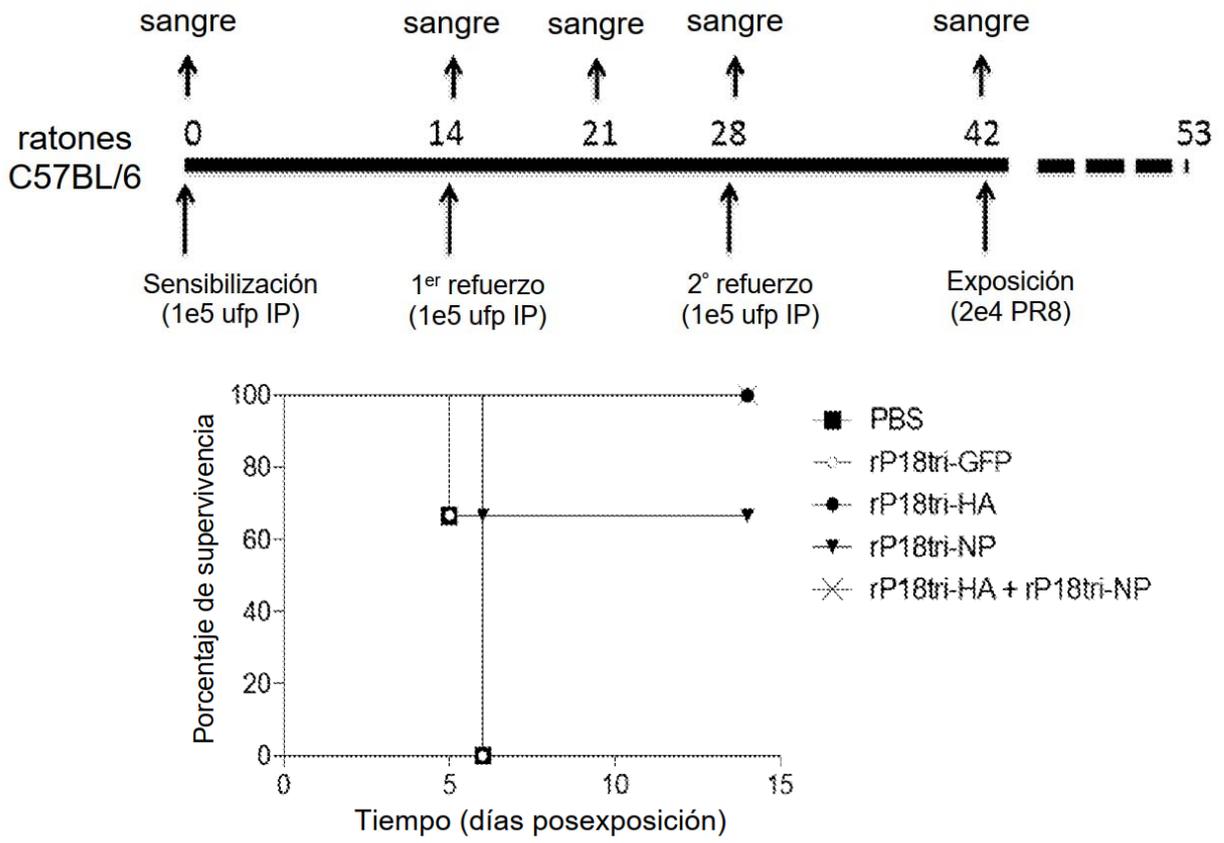
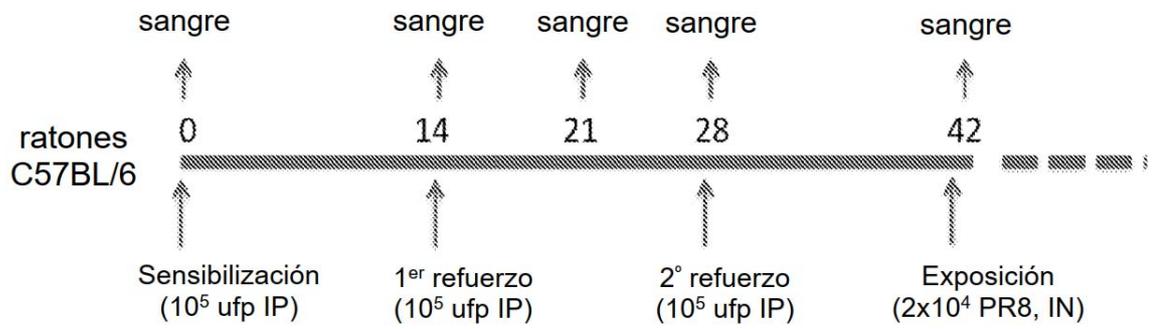


Fig. 8



Título de IHA	0	14	21	28	42
rP18tri-GFP	<10	<10	<10	<10	<10
rP18tri-HA	<10	40, 40, 80	80, 40, 160	80, 80, 320	160, 160, 640
rP18tri-NP	<10	<10	<10	<10	<10

Fig. 9

Título de IHA	Vía	0	14	28
PR8 inactivado con formalina (50ug)	IN	<10	40, 80, 80	40, 640, 80
rP18tri-HA	IN	<10	20, 40, 80	40, 80, 160
rP18tri-HA	IM	<10	80, 80, 160	80, 160, 320
rP18tri-HA	IP	<10	40, 40, 80	80, 80, 320

Fig. 10

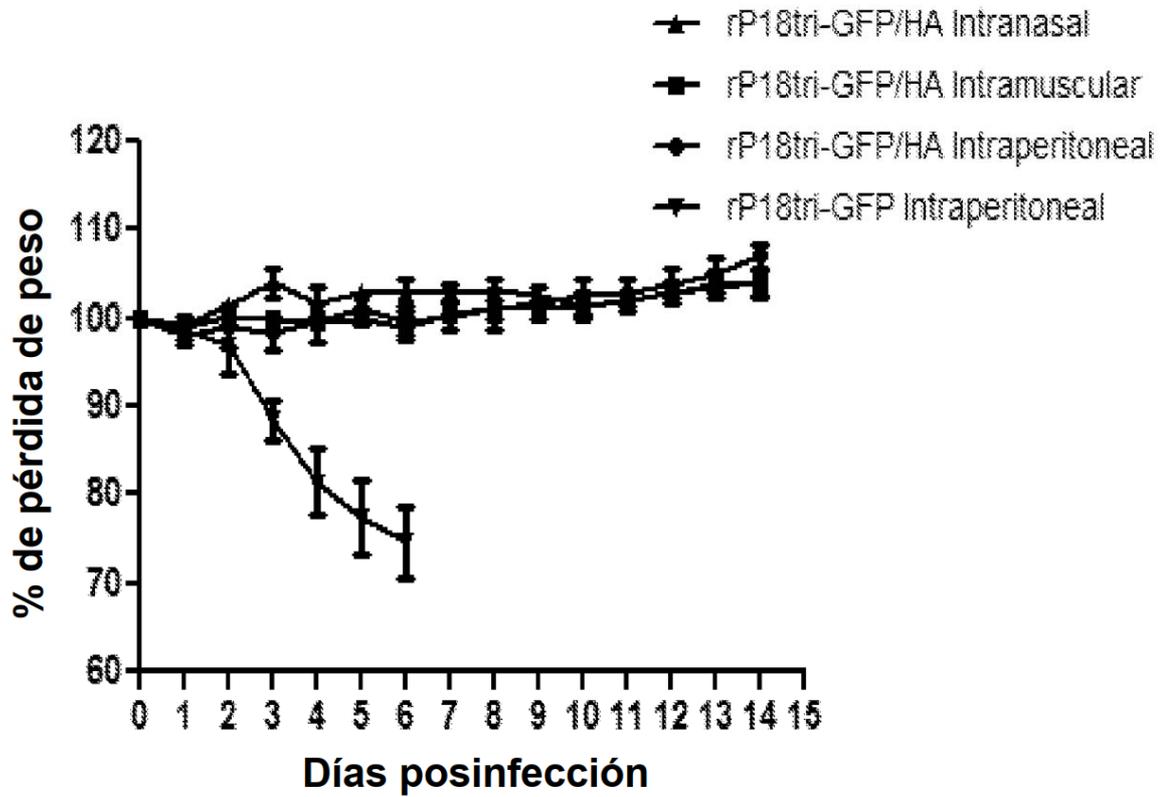


Fig. 11

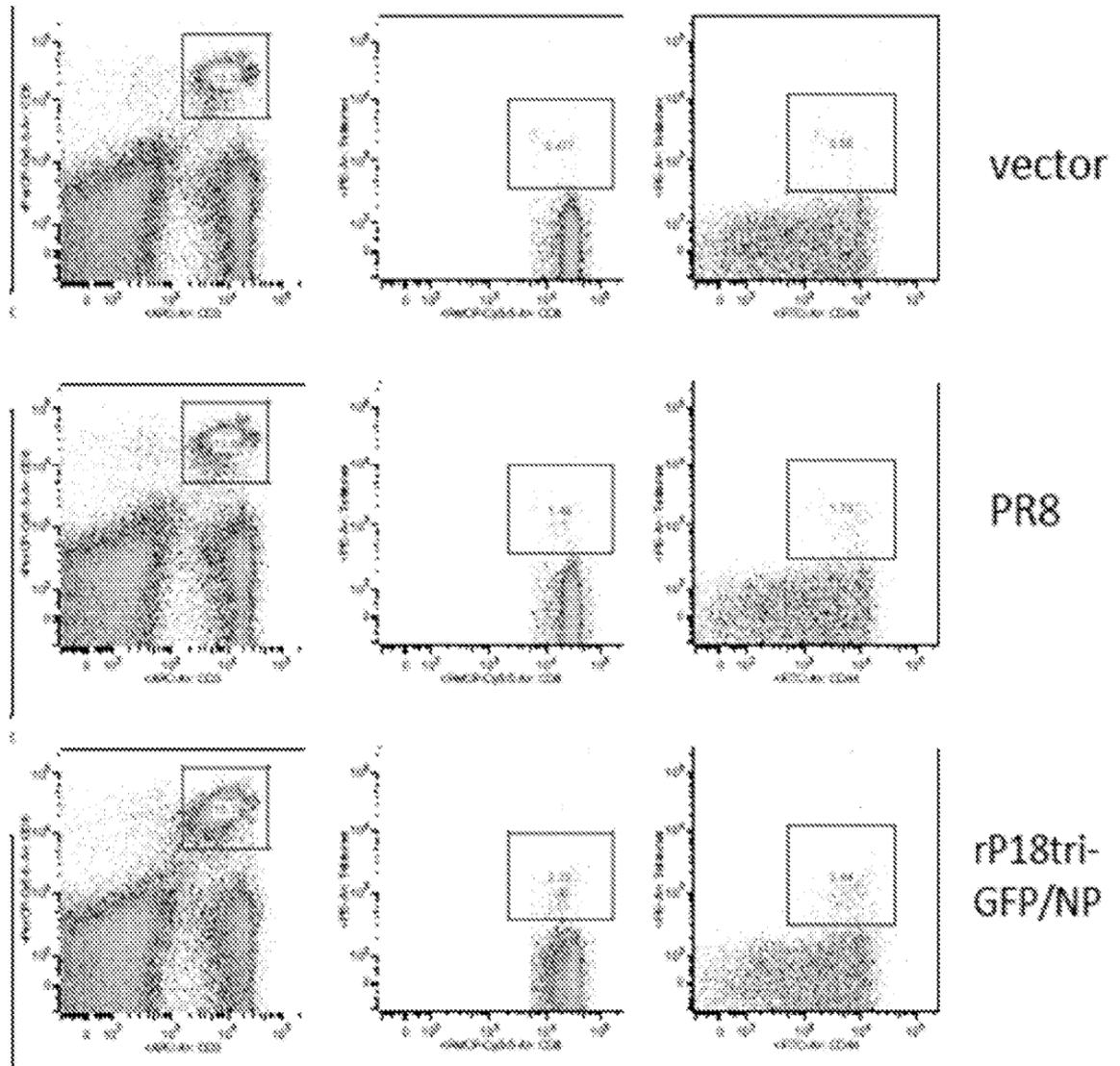


Fig. 12

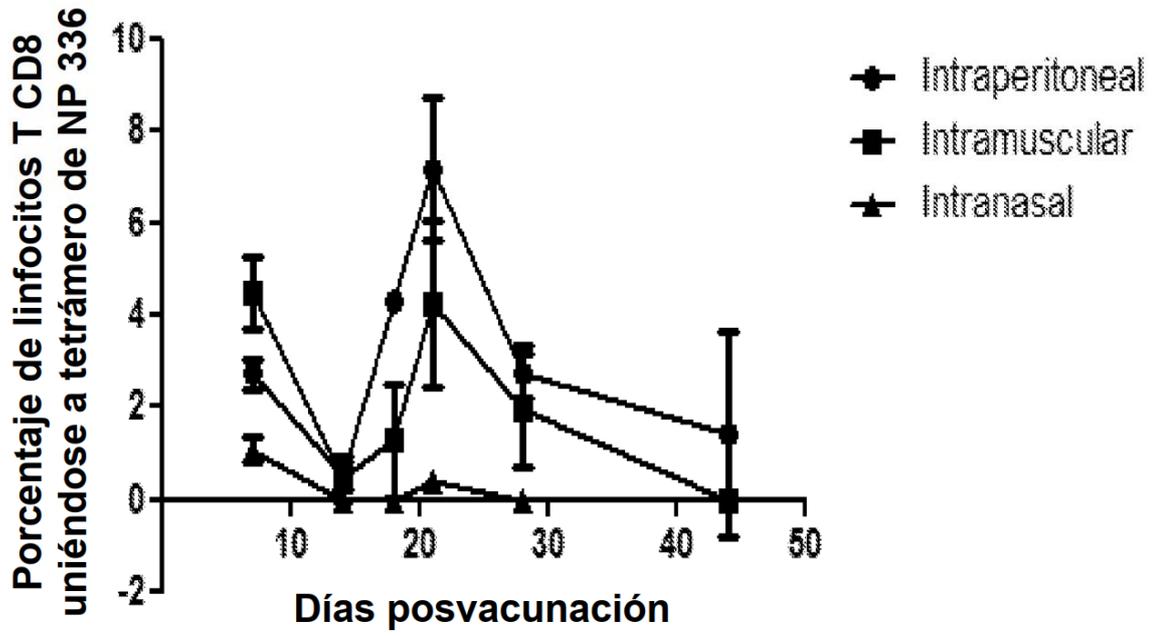


Fig. 13

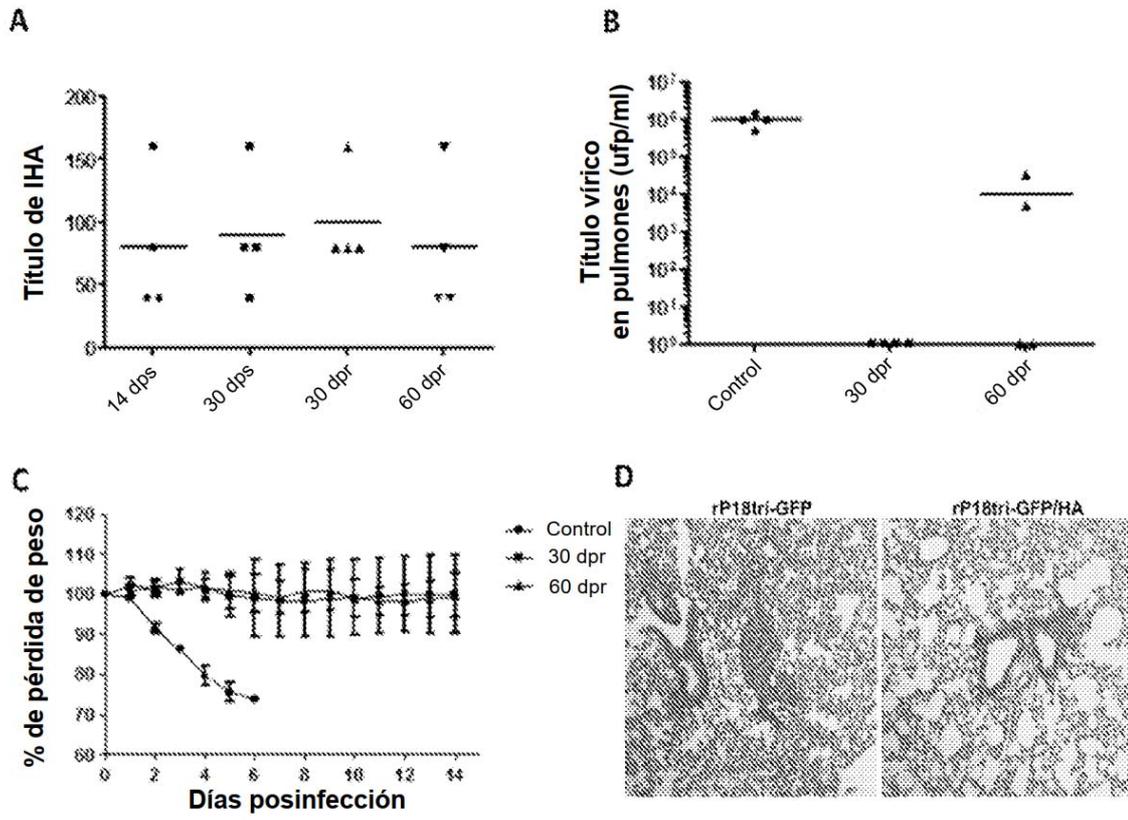


Fig. 14

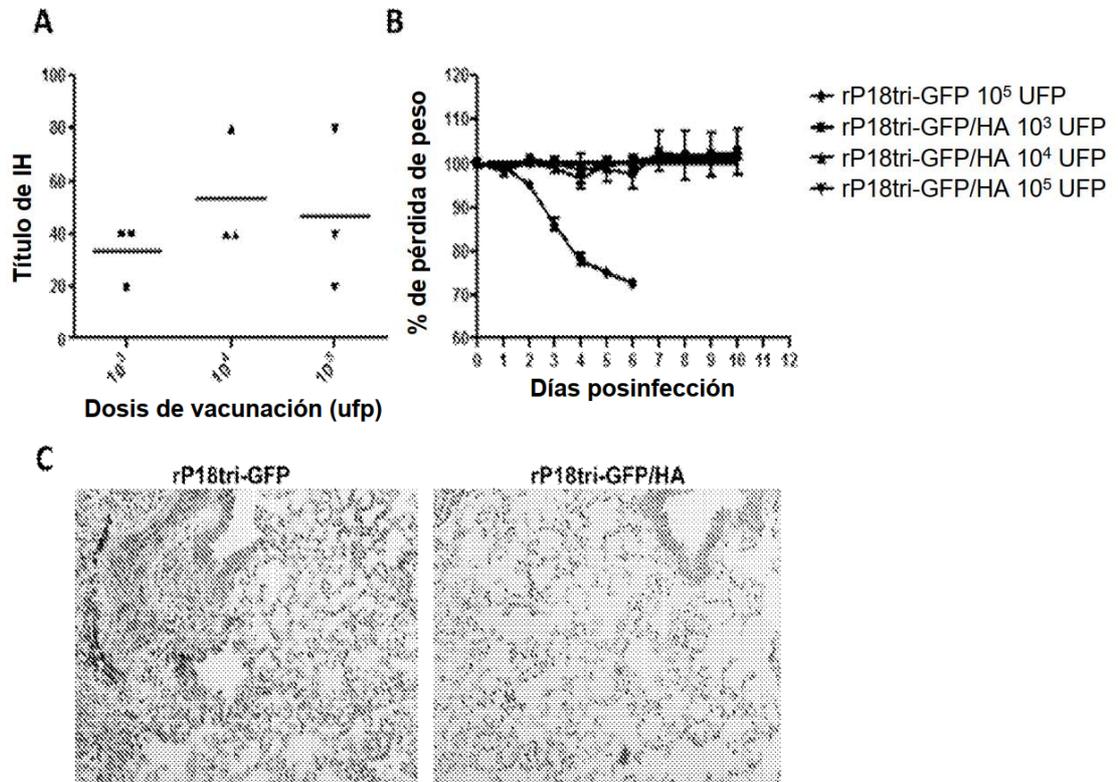


Fig. 15

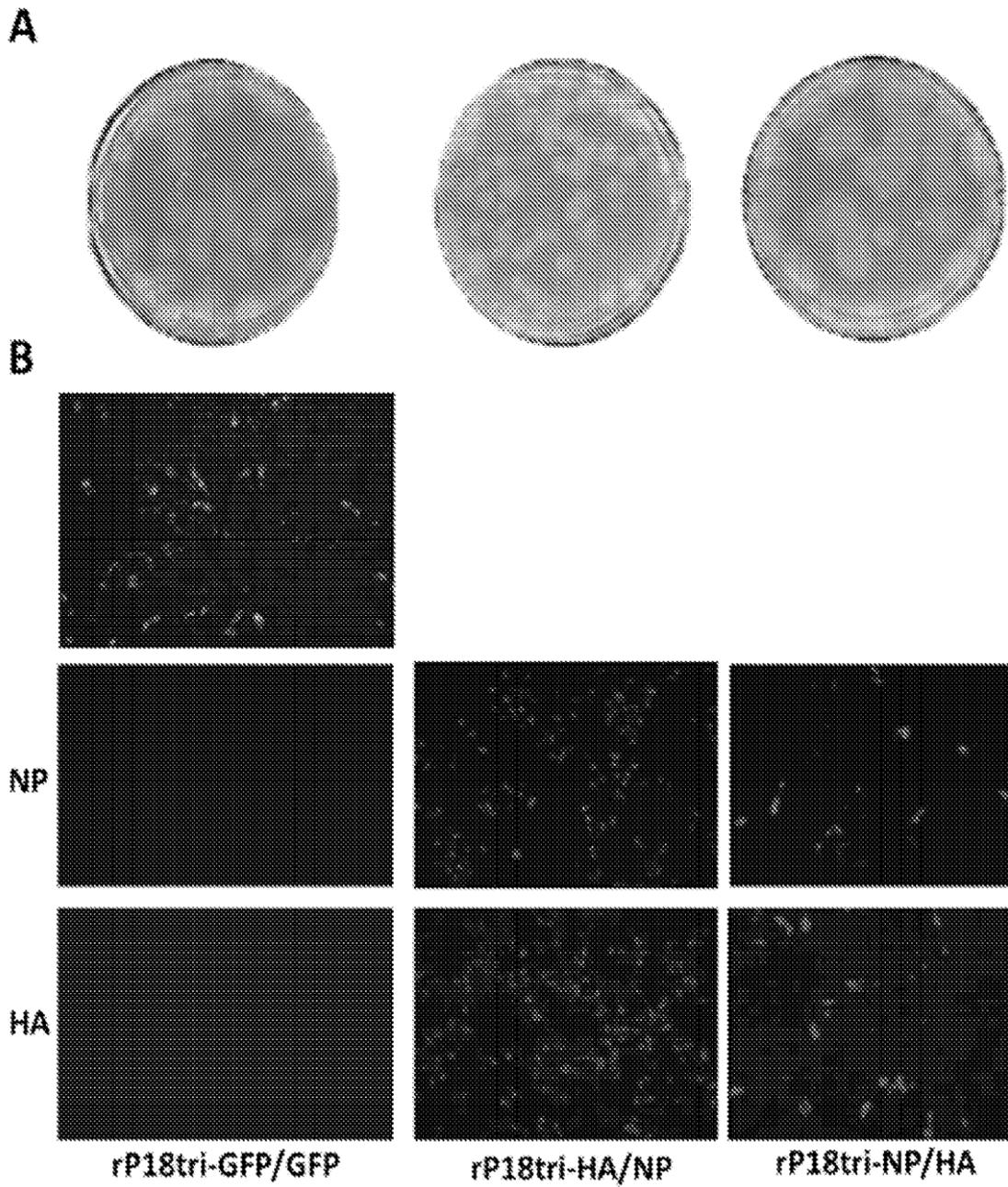


Fig. 16

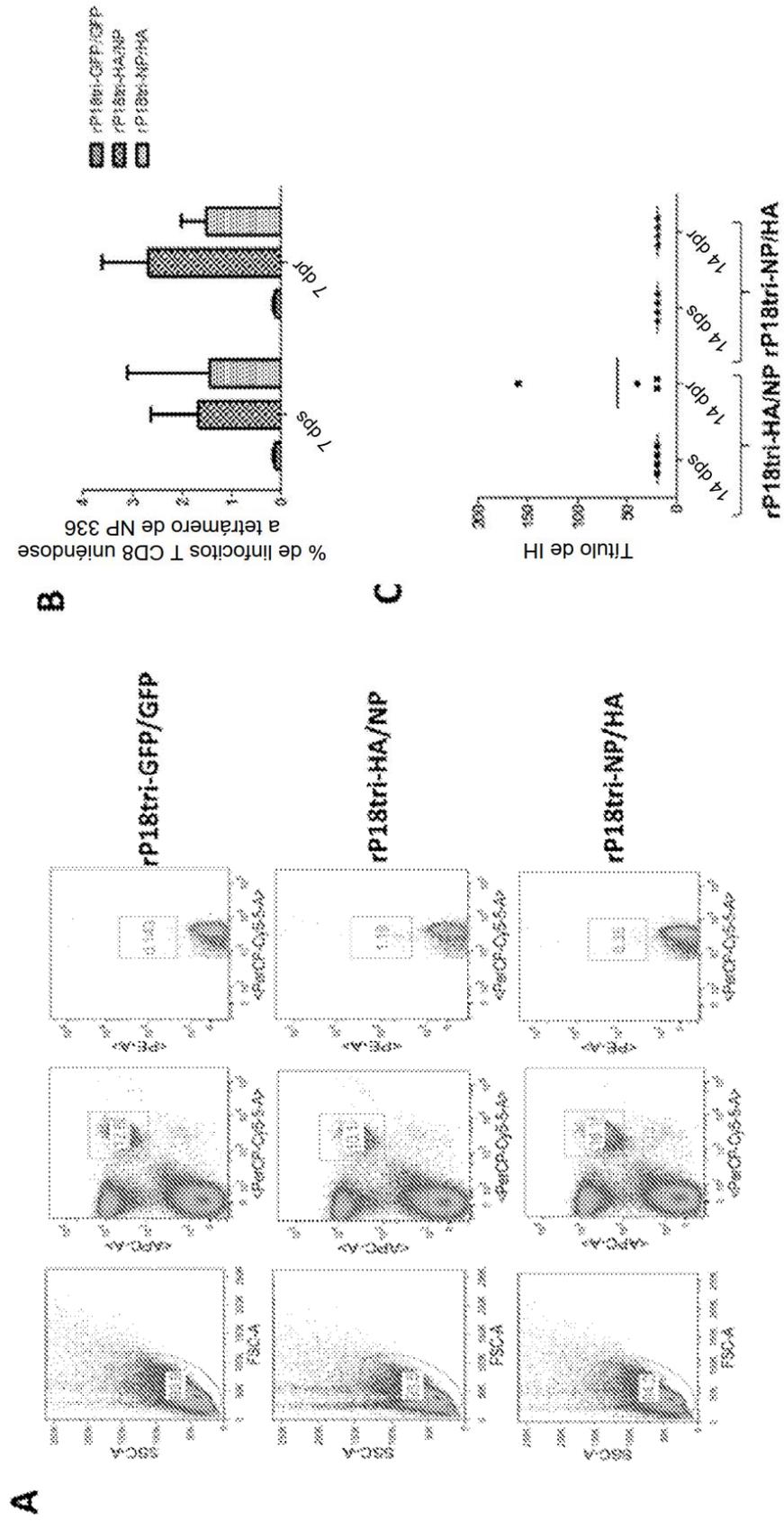
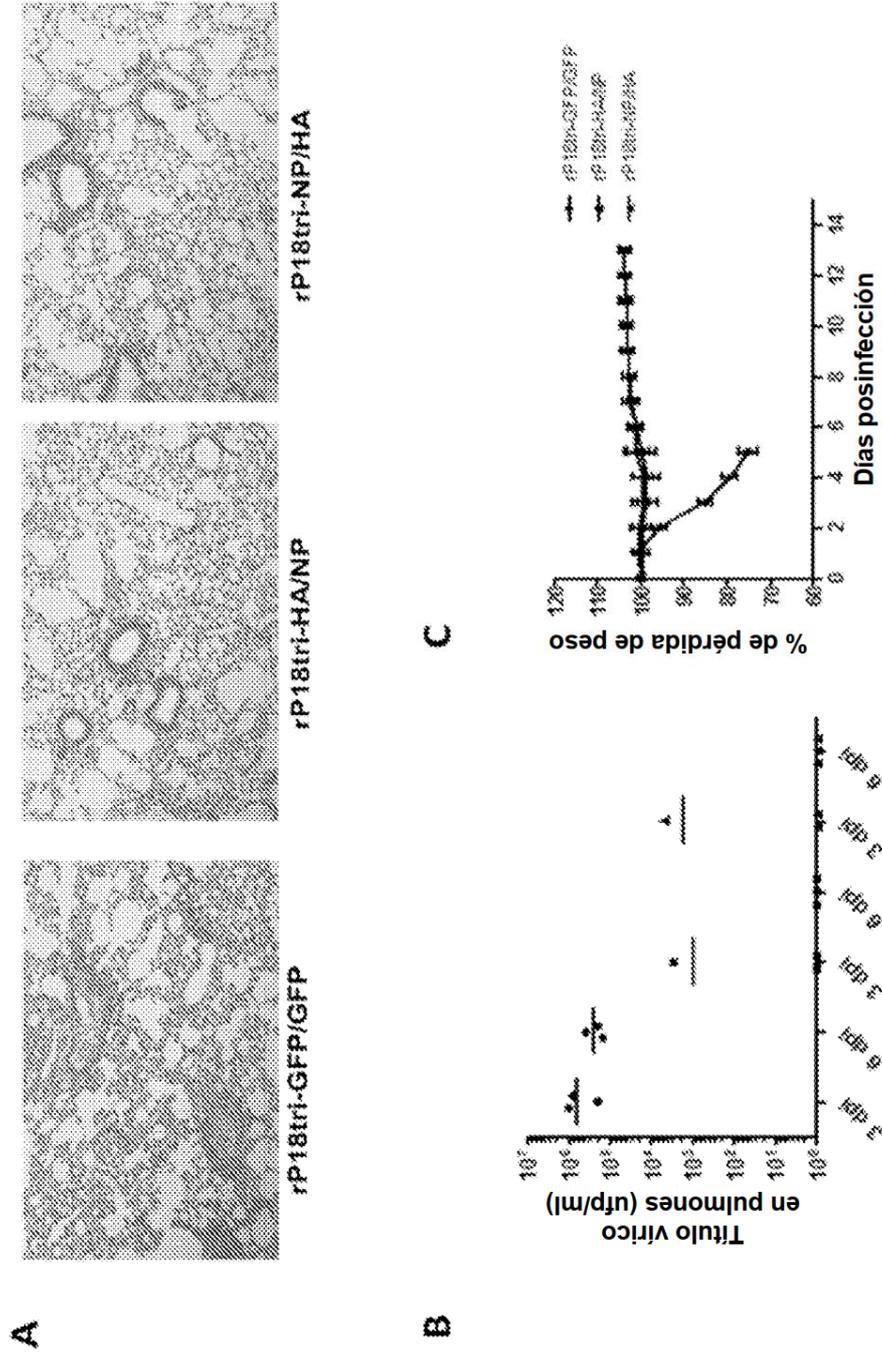


Fig. 17



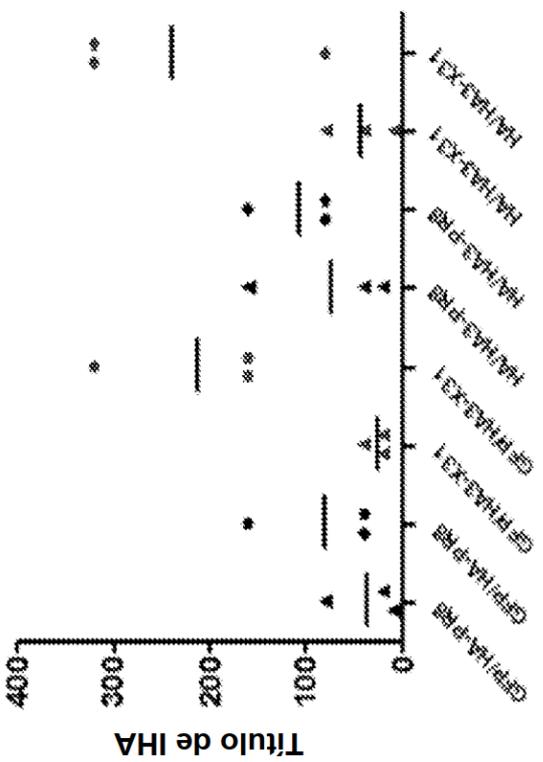
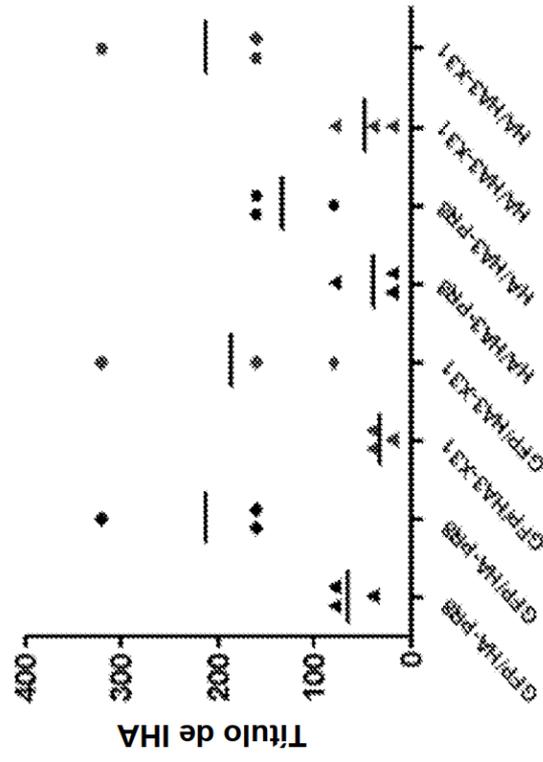


Fig. 18

Fig. 19

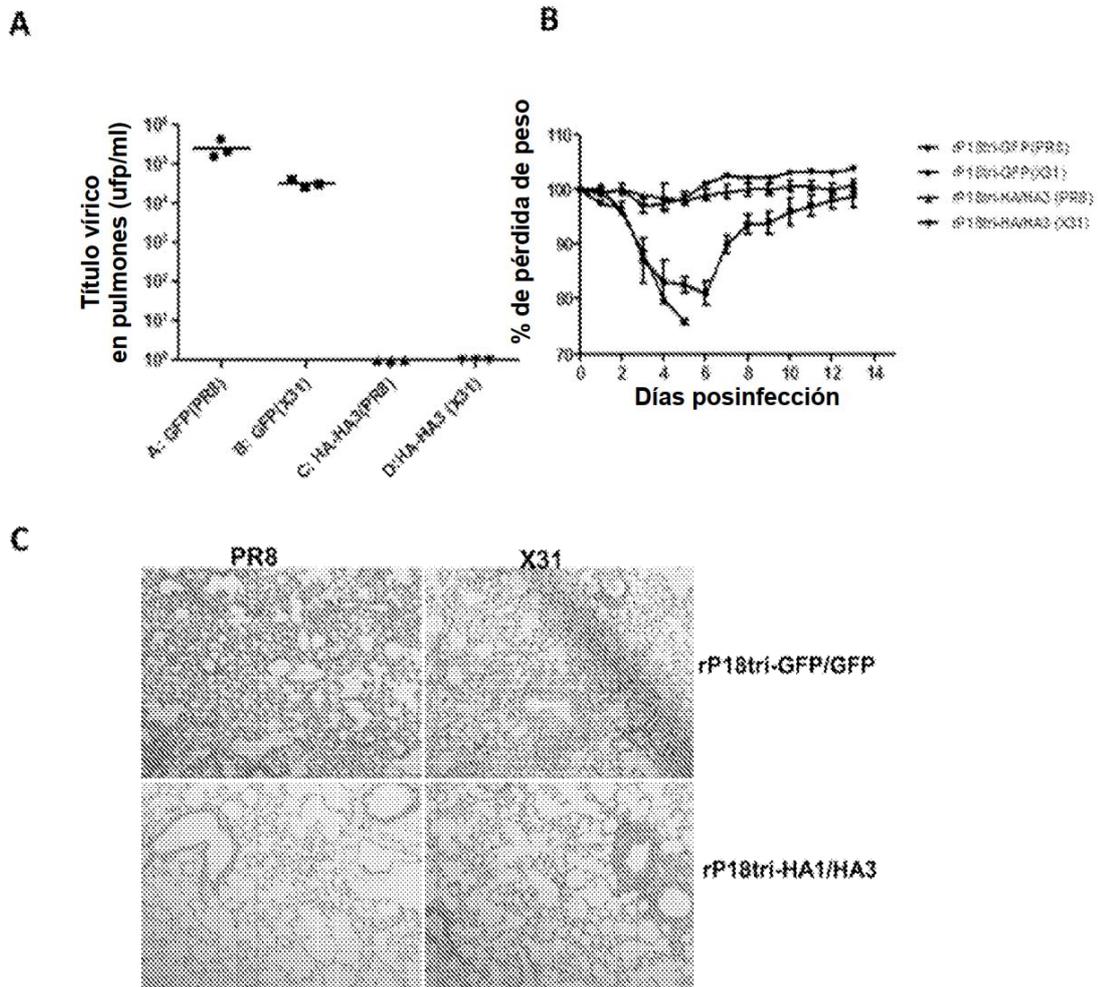


Fig. 20

CD8 NP+/ CD44 NP+	7 d postsensibilización		7 d posrefuerzo	
	Sangre	Bazo	Sangre	Bazo
rP18triGFP/NP IP	2,98/ 2,98	2,63/ 2,58	5,55/ 4,48	6,48/ 6,08

Fig. 21

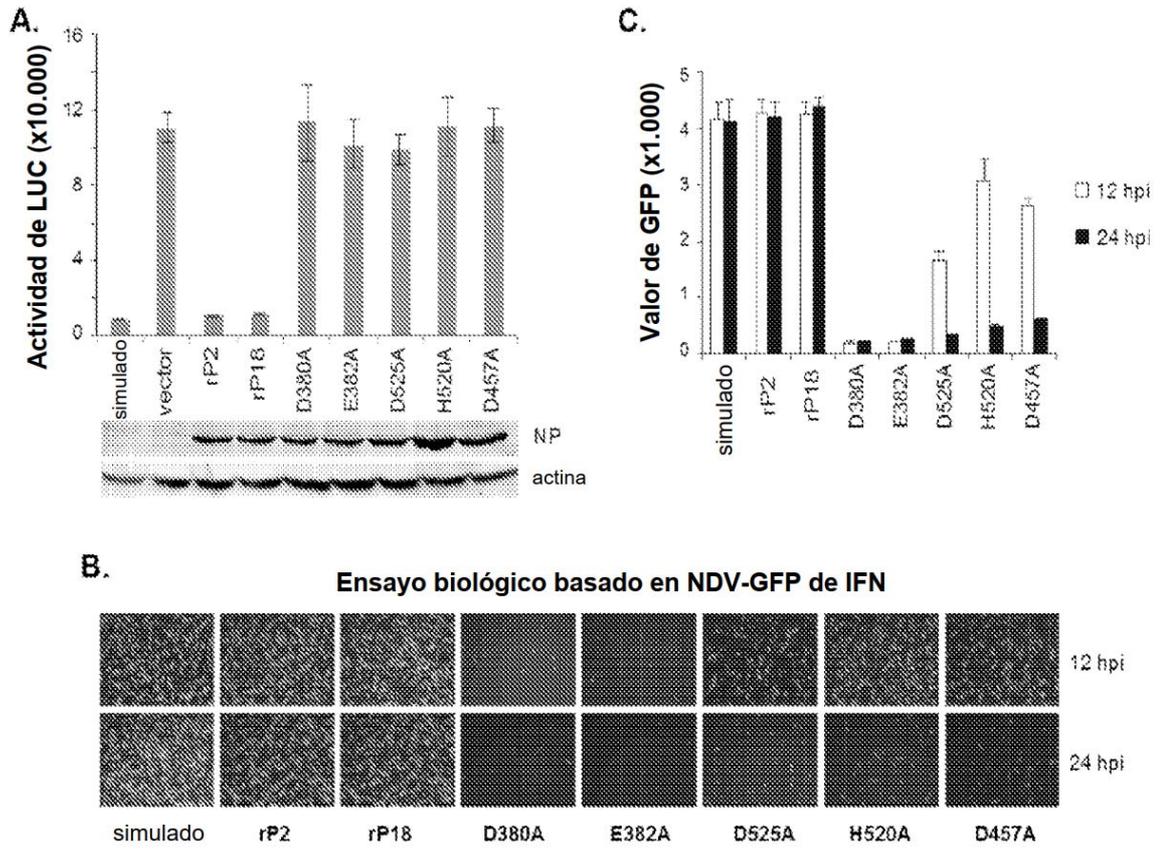
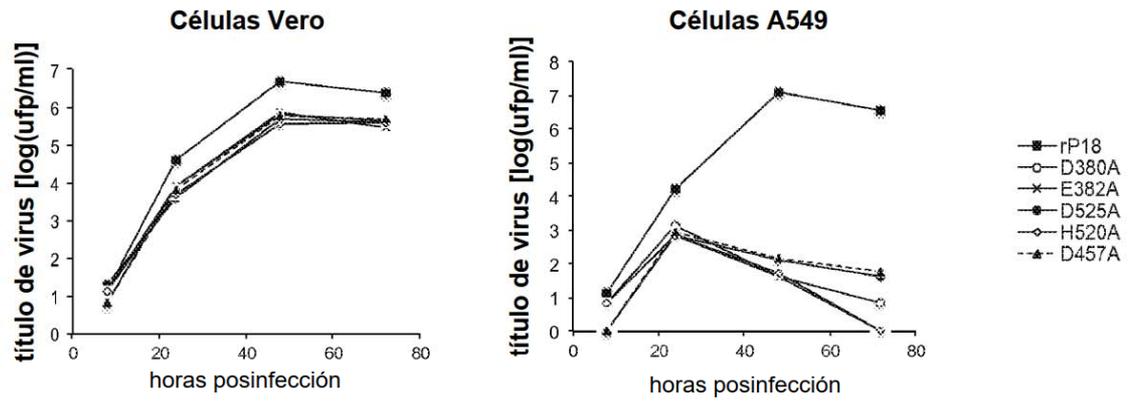


Fig. 22

A.



B.

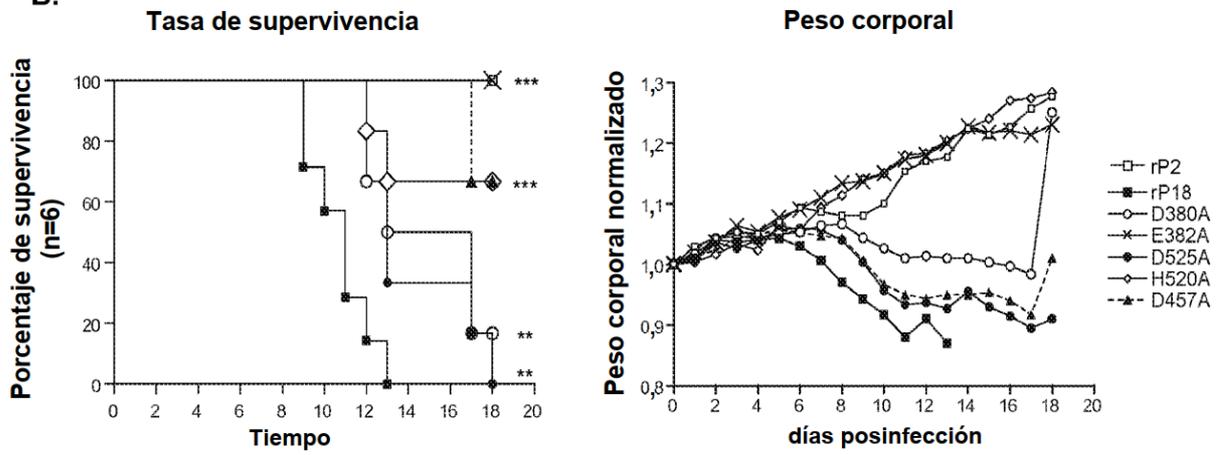


Fig. 23

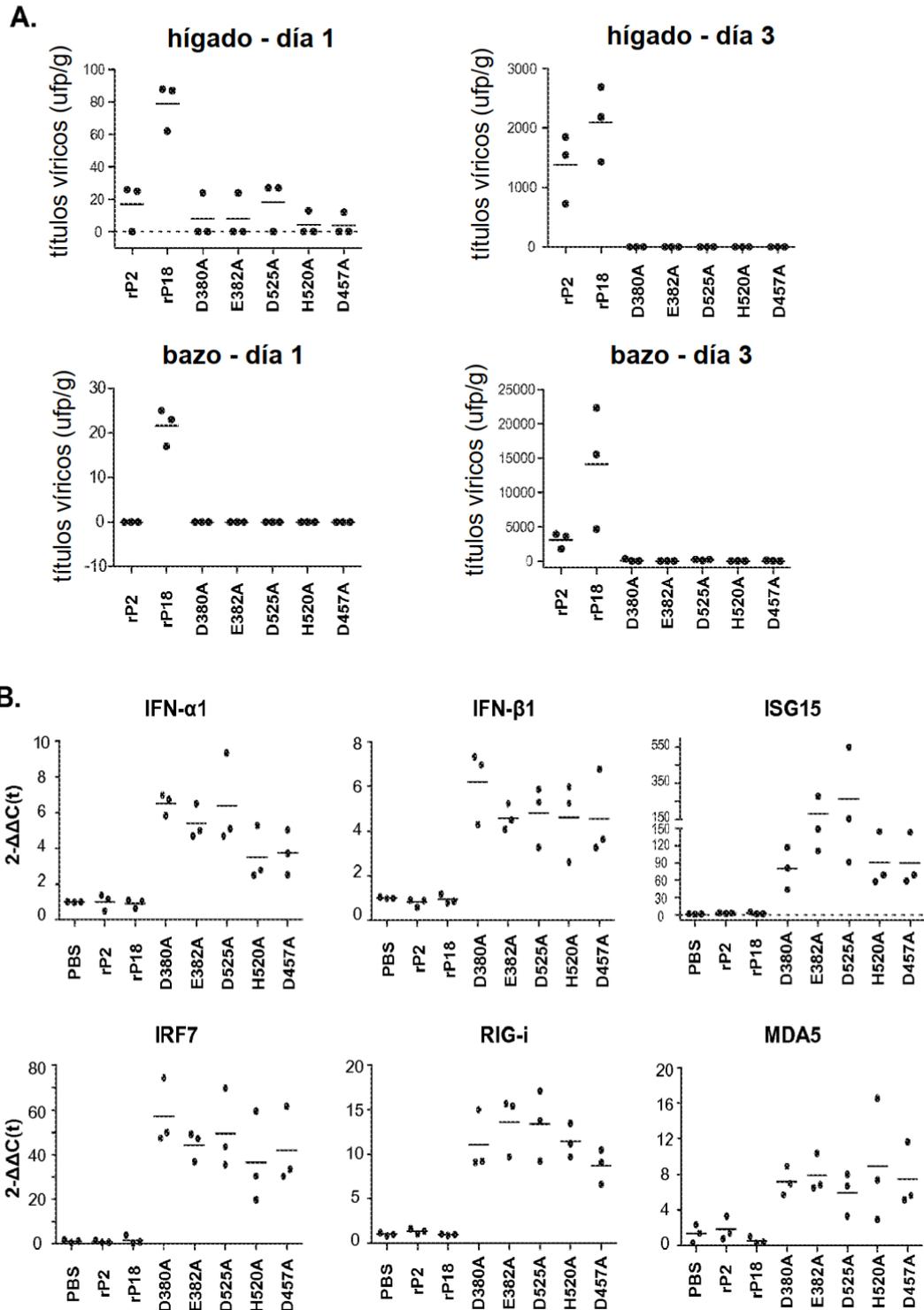


Fig. 24

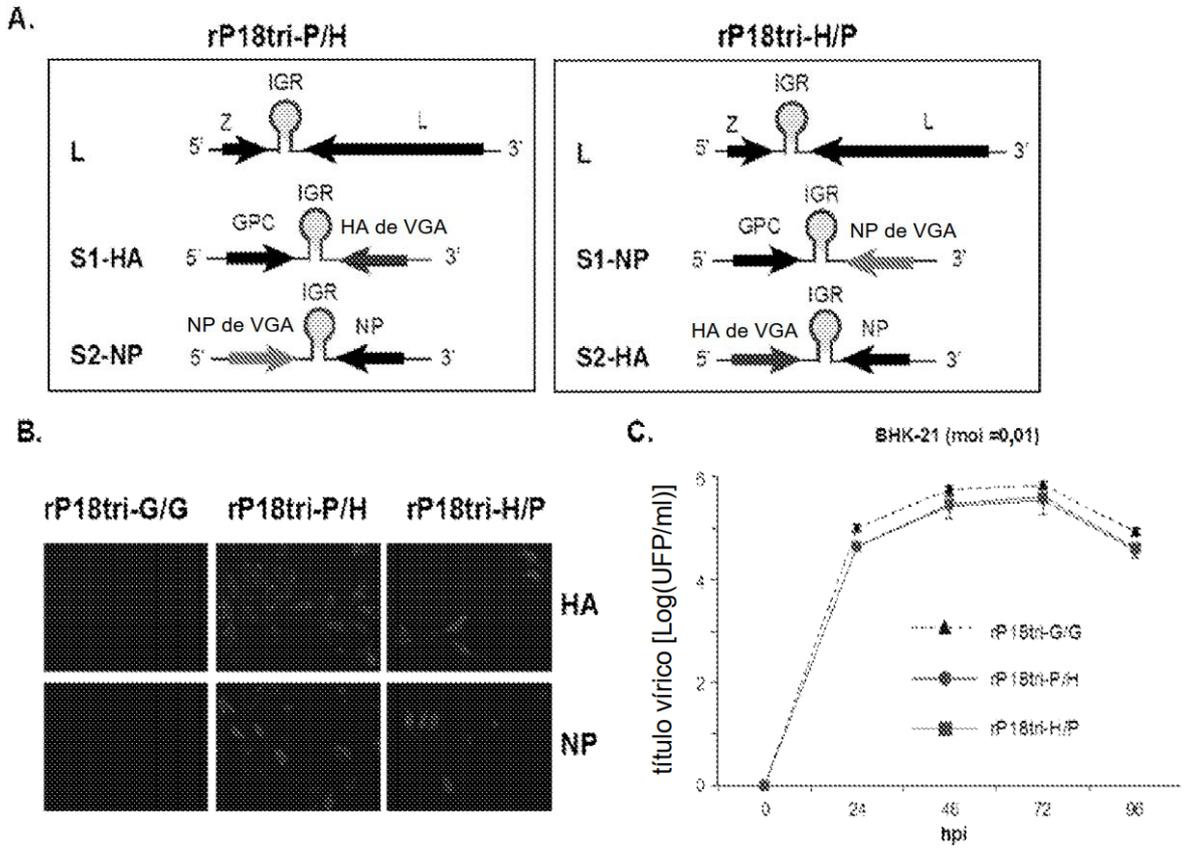


Fig. 25

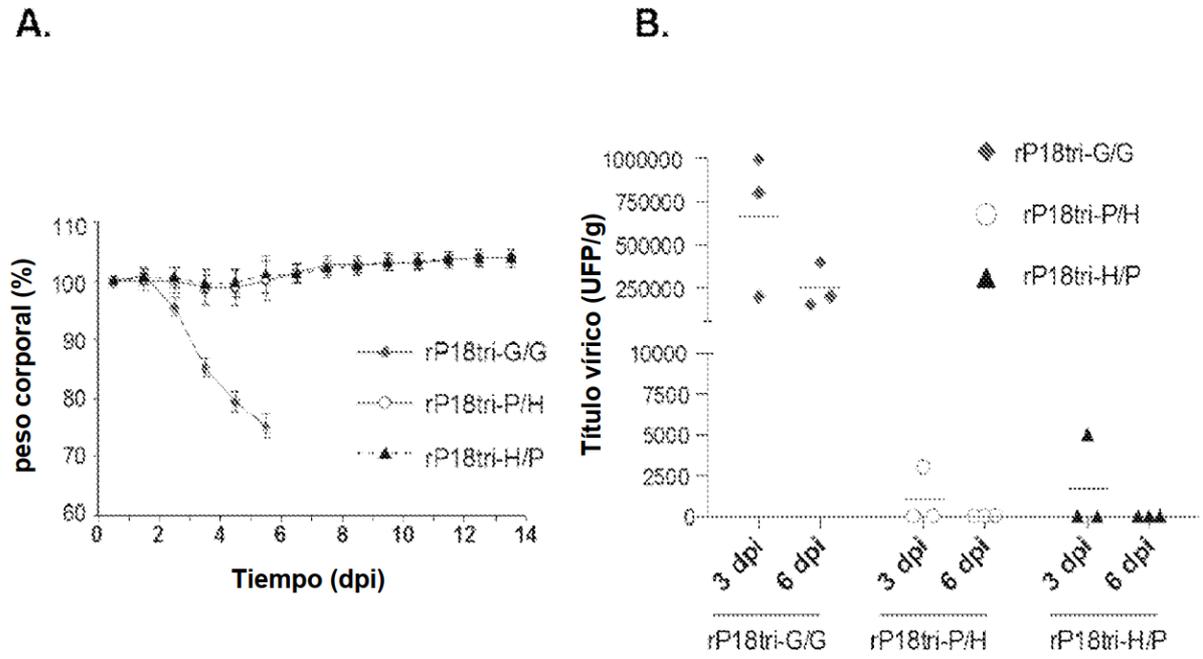


Fig. 26

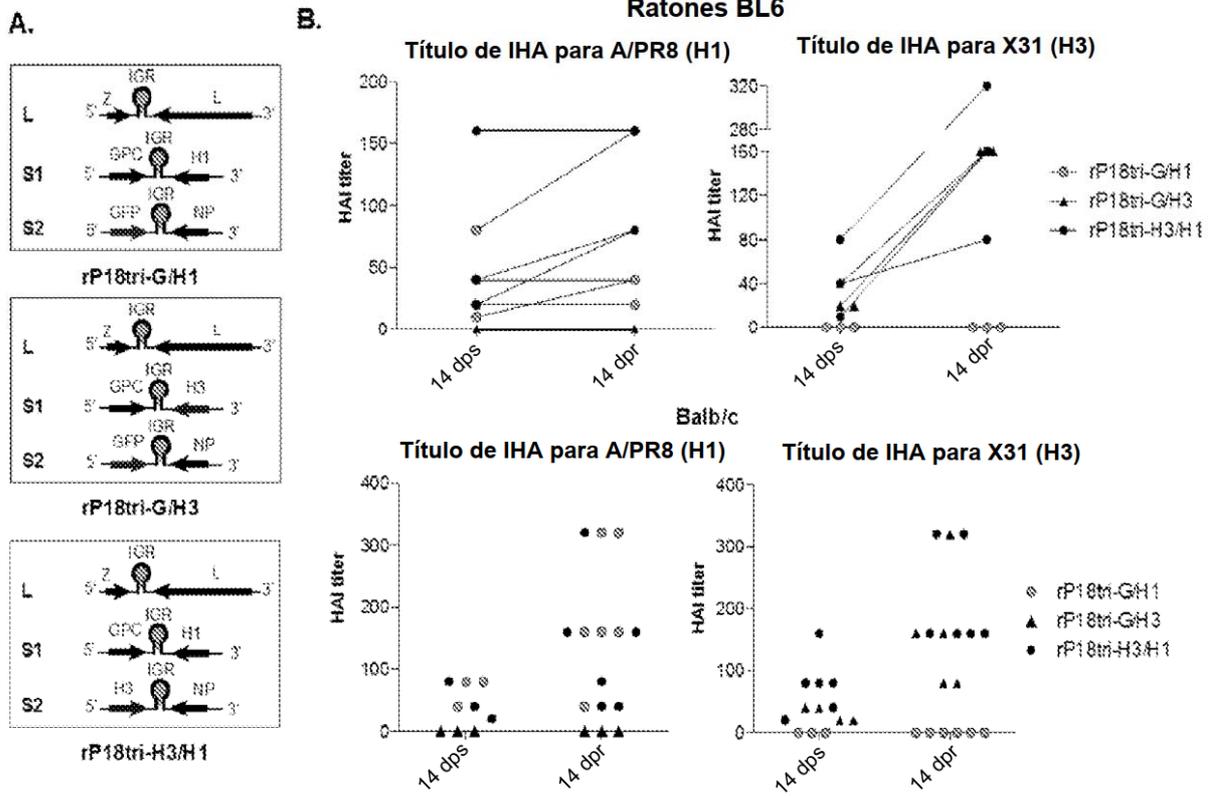


Fig. 27

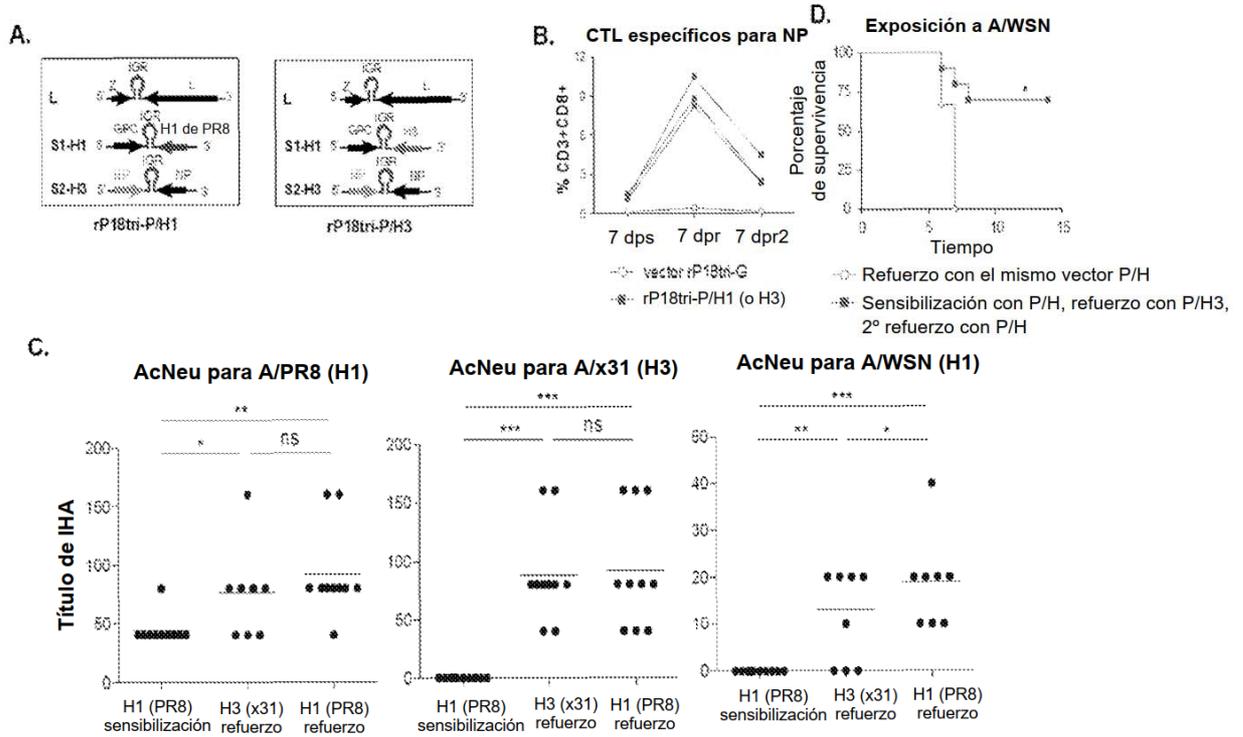


Fig. 28

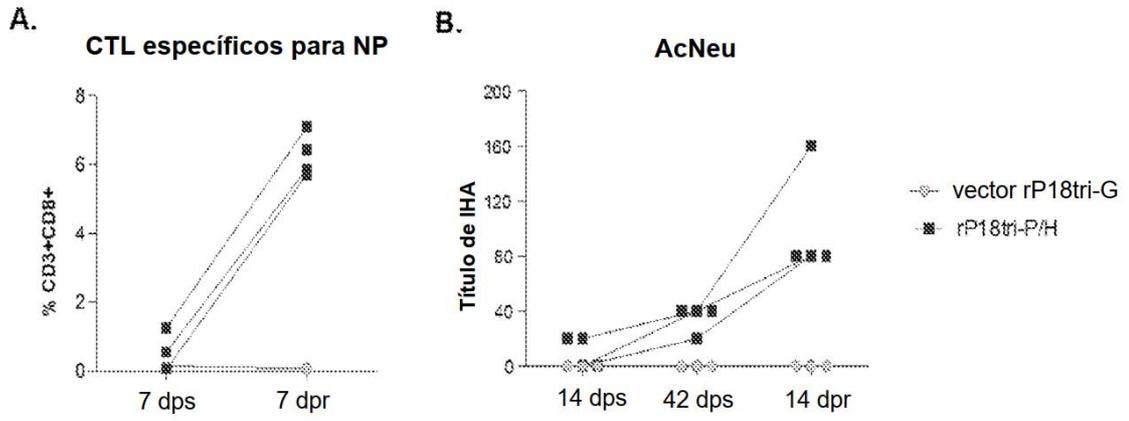


Fig. 29

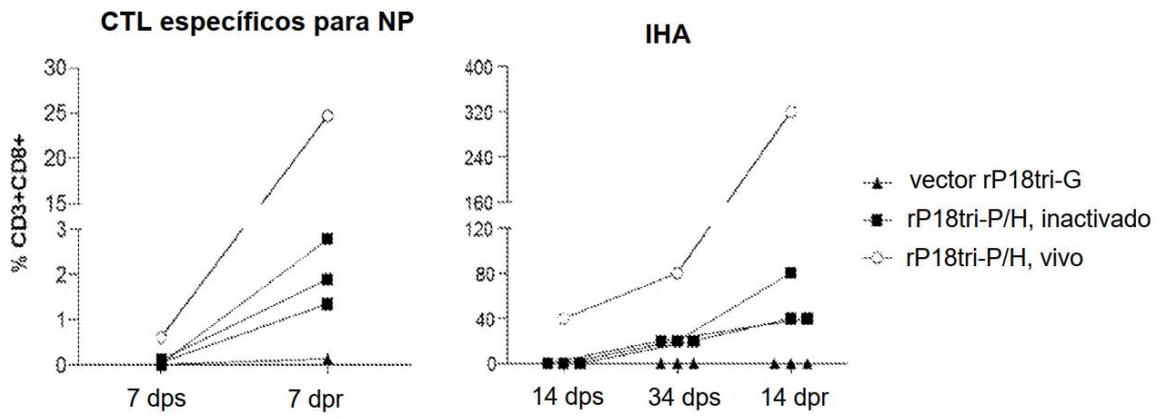


Fig. 30

