

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 965 652**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/12

(2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2014 E 22182269 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2023 EP 4129330**

(54) Título: **Composiciones y métodos para construcciones químéricas del virus del dengue en vacunas**

(30) Prioridad:

15.03.2013 US 201361800204 P

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

16.04.2024

(73) Titular/es:

TAKEDA VACCINES, INC. (50.0%)

75 Sidney Street

Cambridge, MA 02139, US y

THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (50.0%)

(72) Inventor/es:

**STINCHCOMB, DAN T.;
KINNEY, CLAIRE;
KINNEY, RICHARD M. y
LIVENGOOD, JILL A.**

(74) Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 965 652 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

Composiciones y métodos para construcciones químéricas del virus del dengue en vacunas

5 Prioridad

Esta solicitud PCT reivindica la prioridad de la Solicitud Provisional de Estados Unidos Núm. 61/800,204, presentada el 15 de marzo de 2013.

10 Campo

Las realizaciones del presente documento se refieren a composiciones, métodos, usos y procedimientos de fabricación de construcciones del virus del dengue y composiciones de vacunas de las mismas. Algunas realizaciones se refieren a una composición que incluye, pero no está limitada a construcciones de virus 15 flavivirus químéricos que se pueden utilizar solas o combinadas con otras construcciones en una composición de vacuna. En ciertas realizaciones, las composiciones pueden incluir construcciones de más de un serotipo del virus del dengue, tales como virus dengue-1 (DEN-1), virus dengue-2 (DEN-2), virus dengue-3 (DEN-3) y/o virus dengue-4 (DEN-4). En otras realizaciones, la estrategia de fabricación puede mejorar la seguridad y estabilidad genética de vacunas de virus recombinantes, vivos, atenuados, químéricos del dengue (DENVax). 20 Ciertas realizaciones incluyen, al menos, un virus del dengue vivo, atenuado combinado con construcciones químéricas de virus del dengue identificadas por ser tanto seguras como eficaces en composiciones de vacunas donde las construcciones han sufrido pases adicionales en cultivos celulares.

Antecedentes

25

La infección con virus del dengue puede causar fiebre dolorosa de gravedad variable. Hasta la fecha se han identificado cuatro serotipos del virus del dengue: dengue-1 (DEN-1), dengue-2 (DEN-2) o dengue-3 (DEN-3) combinados con dengue-4 (DEN-4). La fiebre del dengue es causada por la infección con un virus del dengue. Otros subtipos pueden ser descubiertos en el futuro (p. ej., DEN-5). Los serotipos 1-4 del virus del Dengue 30 también pueden causar fiebre hemorrágica del dengue (FHD) y síndrome de choque por dengue (SCD). Las consecuencias más severas de la infección, FHD y SCD pueden ser potencialmente mortales. Los virus del dengue causan de 50-100 millones de casos de fiebre del dengue debilitante, 500.000 casos de FHD/SCD y más de 20.000 muertes cada año. Hasta la fecha, no existe una vacuna eficaz para la protección contra la fiebre del dengue y no existe un tratamiento con fármacos para la enfermedad. Los esfuerzos por controlar al mosquito han sido ineficaces en la prevención de los brotes de dengue en áreas endémicas o en la prevención 35 de la propagación geográfica adicional de la enfermedad. Se estima que 3,5 millardos de personas están amenazados por la infección con el virus del dengue. Adicionalmente, el virus del dengue es una de las principales causas de fiebre en los viajeros hacia áreas endémicas, tales como Asia, Centro y Sudamérica y el Caribe.

40

Los cuatro serotipos del virus del dengue son endémicos en todas las regiones tropicales del mundo y constituyen la amenaza más importante de virus transmitidos por mosquitos al ser humano en regiones tropicales, mundialmente. Los virus del Dengue se transmiten a los seres humanos principalmente por el mosquito *Aedes aegypti*. La infección con un serotipo del virus del dengue produce una protección que dura 45 toda la vida contra la re-infección por ese serotipo, pero no previene de una infección secundaria por alguno de los otros tres serotipos del virus del dengue. De hecho, una infección previa con uno de los serotipos del virus del dengue puede conllevar a un aumento en el riesgo de una enfermedad severa (FHD/SCD) ante una infección secundaria con un serotipo diferente. El desarrollo de una vacuna eficaz representa una aproximación importante hacia la prevención y control de esta enfermedad emergente a nivel global. Las inmunizaciones 50 múltiples dificultan una cobertura completa de vacunación tanto para los esfuerzos de salud pública en los países con virus del dengue endémico, como para los viajeros.

55

El documento WO 01/60847 se refiere a la construcción de quireras de flavivirus inmunogénicos y avirulentos. En particular, se utilizan dengue-2 16681, PDK-53-E y PDK-53-V como cadena principal en donde se insertan genes de proteínas estructurales de otros flavivirus, en particular de las cepas de dengue-1 P16007 o PDK-13, la cepa de dengue-3 16562, la cepa de dengue-4 1036 o la cepa NY99 del Nilo Occidental.

60

Huang et al. (2003, J of Virol, 77(21): 11436-11447) se refieren al desarrollo de virus del dengue químéricos basados en una cadena principal de dengue-2. En particular, se utilizaron dengue-2 de tipo salvaje 16681 y las cepas atenuadas PDK-53-V y PDK-53-E como cadena principal en las que se insertaron genes de proteínas estructurales de las cepas del dengue-1, dengue-3 o dengue-4.

65

Osorio et al. (2011, Vaccine, 29:7251-7260) es un artículo de revisión relacionado con el desarrollo de DENVax para la protección contra el dengue.

Butrapet et al. (2000, J of Virol, 74(7):3011-3019) se refiere a la determinación de marcadores de atenuación

de PDK-53 en la región no codificante 5' y las proteínas no estructurales 1 y 3.

Lee et al. (2011, Plos One, 6(10):e25800) se relaciona con los virus de la vacuna vivos atenuados contra el dengue tipo 4 que se pasan en células Vero y los efectos correspondientes sobre la estabilidad genética y la hemorragia inducida por el dengue en ratones.

Compendio

La invención se describe en las reivindicaciones.

10 Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método de tratamiento del organismo humano por medio de terapia.

15 Las realizaciones en el presente documento se refieren a composiciones, métodos y usos de construcciones químéricas de virus del dengue. En algunas realizaciones, la composición puede incluir construcciones químéricas del virus del dengue que tienen una cadena principal de virus del dengue atenuado con algunos genes estructurales de al menos otro serotipo del virus del dengue. Otras realizaciones se refieren a al menos un virus vivo atenuado combinado con uno o más virus del dengue químéricos. Otras realizaciones pueden 20 incluir una composición de virus del dengue químéricos con una cadena principal DEN-2 modificada (p. ej., PDK-53 como cadena principal de partida en P1 (pase 1) y una variabilidad de pases (después del pase y crecimiento *in vitro* en una línea celular permisiva) como se indica para los P2, P3,... P8..P10 etc.) y uno o más componentes estructurales de DEN-1, DEN-2, DEN-3 o DEN-4. En otras realizaciones, se genera una composición inmunogénica cuando, al introducirse en un sujeto, la composición produce una respuesta 25 inmunitaria a uno o más virus del dengue en el sujeto. Por lo tanto, las construcciones contempladas en el presente documento pueden ser generadas y pasadas *in vitro*, y cada uno de los pases proporciona un virus de dengue atenuado contemplado para su uso en una composición de vacuna farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, un virus vivo atenuado puede ser un virus vivo atenuado del dengue-2 solo o combinado con uno o más virus del dengue químéricos.

30 En ciertos ejemplos, las construcciones del virus del dengue químéricos de serotipos del virus del dengue, pueden incluir virus vivos atenuados o virus químéricos de pase 7 (P7) con secuencias de ácidos nucleicos identificadas mediante SEQ ID NOS: 1 ,4, 7 y 10 o secuencias de polipéptidos indicadas por SEQ ID NOS: 2, 3, 5, 6, 8, 9, 11 y 12. Se contempla en el presente documento, que cualquiera de los pases para cualquiera de los virus vivos atenuados descritos en el presente documento, puede ser utilizado en una composición inmunogénica para inducir respuestas inmunitarias al virus del dengue representados (p. ej., serotipos 1-4). De acuerdo con estas realizaciones, se puede administrar a un sujeto una composición inmunogénica que incluye 35 un virus aislado vivo, atenuado P-8, para inducir una respuesta inmunogénica contra uno o más serotipos de virus del dengue, dependiendo de la construcción seleccionada. Adicionalmente, un virus vivo atenuado, puede ser combinado con uno o más de estos virus químéricos. Esto se contempla para cada uno de los virus vivos atenuados aislados/producidos en cada uno de los pases de células subsiguiente (p. ej., producción de células Vero de Mono Verde Africano, denominadas en delante: células Vero). La presente invención contempla que cualquier línea celular (p. ej., banco de células producidas empleando buenas prácticas de producción (BPP), con la aprobación de la FDA o la EMA) capaz de producir virus del dengue, es de utilidad para pasar cualquiera de las construcciones virales a escala de fabricación o es apropiada para su uso subsiguiente en vacunas o 40 composiciones inmunogénicas contra el virus del dengue.

45 En otras realizaciones, las composiciones contempladas en el presente documento pueden ser combinadas con otras composiciones inmunogénicas contra otros Flavivirus tales como el virus del Nilo Occidental, la encefalitis japonesa o cualquier otra construcción químérica de flavivirus y/o virus vivo atenuado. En ciertas realizaciones, se puede utilizar una única composición contra múltiples flavivirus.

50 En ciertas realizaciones una composición inmunogénica de la presente divulgación puede incluir virus del dengue químéricos contra uno o más de DEN-1, DEN-2, DEN-3 y/o DEN-4, sola o combinada con una composición de virus del dengue vivo atenuado.

55 En otras realizaciones, una construcción puede incluir una construcción con mutaciones adaptativas en las regiones estructurales o no estructurales del virus que aumentan el crecimiento o producción sin afectar a la atenuación o seguridad del virus al ser introducido en un sujeto. En ciertas realizaciones cualquiera de las 60 construcciones de virus del dengue químérico contemplada puede incluir un virus DEN-2 atenuado vivo con mutaciones específicas utilizado como cadena principal donde el virus DEN-2 atenuado vivo PDK incluye adicionalmente proteínas estructurales de una o más de las proteínas estructurales prM (premembrana) y E (envoltura) de los otros serotipos de virus del dengue. Además, una cadena principal DEN-2 puede incluir mutaciones adicionales con el fin de aumentar la producción o mejorar la respuesta inmunitaria a una 65 composición predeterminada en un sujeto tras la administración (p. ej., virus del Dengue químérico 2/1, 2/3 o 2/4).

En algunas realizaciones, los genes de las proteínas estructurales pueden incluir genes prM y E de DEN-1, DEN-2, DEN-3 o DEN-4 en una cadena principal de DEN-2 que tenga una o dos mutaciones que son parte de un virus del dengue vivo atenuado. Por ejemplo, una construcción de dengue, en ciertas realizaciones, puede

- 5 incluir aquellas construcciones denominadas DENVax-1-A, DENVax-2-F, DENVax-3-F, y DENVax-4-F (véase la sección de ejemplos) donde la cadena principal de DEN-2 tiene una o más mutaciones (p. ej., no encontradas en virus P1 o en otros pasados previamente o PDK-53) del virus vivo atenuado DEN-2 que se ha demostrado previamente que es seguro y eficaz para inducir una respuesta inmunitaria. El virus vivo atenuado DEN-2 de la presente solicitud es una versión mejorada del virus vivo atenuado DEN-2 empleado originalmente. Una 10 construcción químérica puede incluir una cadena principal DEN-2 PDK-53 modificado atenuado, que tenga una o más proteínas estructurales del segundo serotipo de virus del dengue, en donde las proteínas estructurales pueden incluir mutaciones adicionales para aumentar la respuesta inmunogénica a la construcción químérica. En algunas realizaciones, ciertas mutaciones adquiridas mediante DEN-2 PDK-53 atenuado pueden producir 15 un cambio conservativo de aminoácido o no en una construcción diferente de la construcción P1, que puede dar como resultado rasgos deseables para la producción, etc.

En otras realizaciones, se puede utilizar un genoma vivo atenuado de DEN-2 para generar construcciones del serotipo 1 del virus del dengue (DEN-1) y del serotipo 3 de virus del dengue (DEN-3), del serotipo 4 del virus del dengue (DEN-4) donde uno o más genes de proteínas estructurales del genoma viral de DEN-2 pueden

- 20 reemplazarse por uno o más genes de proteínas estructurales de DEN-1, DEN-3 o DEN-4, respectivamente. En algunas realizaciones, una proteína estructural puede ser la proteína C, prM o E de un segundo virus del dengue. En ciertas realizaciones los genes de proteínas estructurales incluyen los genes prM y E de DEN-1, DEN-3 o DEN-4. Estos virus híbridos expresan los antígenos superficiales de DEN-1, DEN-3 o DEN-4 reteniendo los fenotipos de atenuación del progenitor atenuado DEN-2.

- 25 Las construcciones divulgadas en el presente documento pueden incluir construcciones químéricas de DEN-4, DEN-2, DEN-1 y DEN-3 que expresen antígenos superficiales de DEN-1, DEN-3 y DEN-4 utilizando el virus DEN-2 atenuado como cadena principal.

- 30 En ciertas realizaciones, las composiciones de la presente divulgación pueden incluir una composición que comprende una sola construcción químérica del virus del dengue, divulgada en el presente documento y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptables. De forma alternativa, las composiciones de la presente divulgación pueden incluir una composición que comprende dos o más, o tres o más construcciones químéricas del virus del dengue divulgadas en el presente documento y un portador o excipiente farmacéuticamente

- 35 aceptables. De acuerdo con estas realizaciones, se pueden combinar una o más construcciones químéricas del virus del dengue contempladas en el presente documento con uno o más virus del dengue vivos atenuados. En ciertas realizaciones, un virus vivo atenuado puede ser un virus vivo atenuado DEN-2, en donde mutaciones adicionales en las regiones NCR, NS1 o en otras regiones, aumentan la respuesta inmunitaria, aumentan el crecimiento viral o proporcionan otra mejora un virus del dengue vivo atenuado mejorado.

- 40 En ciertas realizaciones, han sido determinados previamente los loci de atenuación, nucleótido 5'NCR-57-T, NS1-53-Asp, y NS3-250-Val, de la vacuna de DENV-2 y todos estos cambios son compartidos por el antecedente genético común específico del virus PDK-53 de los cuatro virus DENVax. La secuencia genética de los tres loci de atenuación, así como los fenotipos de atenuación previamente establecidos *in vitro* e *in vivo*

- 45 de estos candidatos de vacunas fueron cuidadosamente verificados para las semillas cBPP DENVax. Este informe describe las estrategias empleadas para generar semillas de virus maestras (MVS, por sus siglas en inglés) así como su caracterización genética y fenotípica para su uso en la fabricación de composiciones de vacunas de virus del dengue. Estas MVS pueden utilizarse para fabricar materiales clínicos y finalmente suministros de vacunas comerciales.

50 Breve descripción de los dibujos

Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertas realizaciones. Algunas realizaciones pueden entenderse mejor haciendo referencia a uno o más de estos dibujos, solos o combinados con la descripción detallada de las realizaciones específicas presentadas.

55 La Fig. 1 representa un diagrama ilustrativo que refleja una construcción químérica ilustrativa de la presente divulgación, DEN-2/DEN-4 comparada con construcciones previamente generadas y virus del dengue de tipo salvaje.

La Fig. 2 representa un histograma ilustrativo que compara varias respuestas al emplear una cadena principal de DEN-2 vivo atenuado (con mutaciones adicionales) y un segundo serotipo de virus del dengue como componentes estructurales sustituidos por los componentes estructurales del dengue-2 (p. ej., MVS de DENVax-1). Esta gráfica ilustra los tamaños de placa de MVS de DENVax. Se incluyeron virus del Dengue de tipo salvaje y virus candidatos a vacunas de grado de investigación previamente publicados como control y

comparación. Esta gráfica ilustra la producción mejorada de las construcciones de virus del dengue comparados con las construcciones químéricas del virus de dengue de control.

5 La Fig. 3 representa un histograma ilustrativo que representa las sensibilidades a la temperatura de MVS (Semilla de Virus Maestra) de DENVax. Se incluyeron virus del Dengue de tipo salvaje y virus candidatos a vacunas de grado de investigación previamente publicados para la comparación con grado de MVS.

10 La Fig. 4 representa un histograma ilustrativo que representa el crecimiento viral de MVS de DENVax en células C6/36 comparadas con los controles. Se incluyeron virus del Dengue de tipo salvaje y virus candidatos a vacunas de grado de investigación para la comparación con MVS de DENVax.

15 Las Fig. 5A-5C representan gráficas ilustrativas de neurovirulencia en ratones recién nacidos. Resultados reunidos de varios experimentos que resumen la neurovirulencia del virus DENV-2 16681 wt en ratones recién nacidos CDC-ICR ($n=72$) y Taconic-ICR ($n=32$) sensibilizados por vía i.c. con 10^4 ufp del virus (A). neurovirulencia de MVS de DENVax probada en ratones Taconic-ICR con una dosis de 10^4 ufp (B) o 10^3 ufp (C). Se indica el número de animales sometidos a prueba por grupo en un experimento ($n=16$) y dos experimentos reunidos ($n=31$ o 32).

20 La Fig. 6 representa un histograma ilustrativo que muestra el tamaño de placa de MVS, WVS y BVS de DENVax. Los diámetros promedio de placa \pm DT (barras de error) de las placas del virus en células Vero o LLC-MK₂ con recubrimiento de agarosa medidos en el día 9 pi. Se incluyeron DENV de tipo salvaje y virus candidatos a vacunas previamente publicados de grado de investigación con fines de control y comparación.

25 La Fig. 7 representa un histograma ilustrativo que muestra el crecimiento del MSV, WVS y BVS de DENVax en células C6/36 a dos temperaturas de incubación para verificar la retención de este marcador de atenuación *in vitro* después de una fabricación a gran escala.

30 La Fig. 8 representa un histograma ilustrativo del crecimiento restringido de MVS, WVS y BVS de DENVax en células C6/36. Títulos medios \pm DT (barras de error) de los virus replicados en células C6/36 a 7 días pi. Se incluyeron virus del Dengue wt y virus candidatos a vacunas de grado de investigación, previamente publicados con fines de comparación.

35 Las Fig. 9A-9B representan gráficos ilustrativos de datos de neurovirulencia de MVS de DENVax en ratones ICR recién nacidos. (A) inoculaciones IC del virus a una dosis de 10^4 UFP. (B) inoculación IC del virus a una dosis de 10^3 UFP.

La Fig. 10 representa un diagrama ilustrativo que compara nuevos virus vivos atenuados con virus del dengue vivos atenuados previamente generados.

40 Definiciones

Como se emplea en el presente documento, los términos "un", "una" o "uno" pueden significar uno o más de un objeto.

45 Como se emplea en el presente documento en la memoria descriptiva, los términos "sujeto" o "sujetos" pueden incluir, pero no están limitados a, mamíferos tales como humanos o mamíferos, domésticos o salvajes, por ejemplo, perros, gatos y otras mascotas caseras (p. ej., hámsteres, cobayas, ratones, ratas), hurones, conejos, cerdos, caballos, ganado vacuno, perros de la pradera, roedores salvajes o animales de zoológico.

50 Como se emplean en el presente documento, los términos "virus quimera" o "virus químico", "flavivirus quimera" y "flavivirus químico" pueden significar una construcción que comprende una porción de la secuencia de nucleótidos de un virus del dengue-2 y adicionalmente una secuencia de nucleótidos que no es del virus del dengue-2 o es de un flavivirus diferente. Un "dengue quimera" comprende al menos dos serotipos diferentes de virus del dengue, pero no un flavivirus diferente. Por lo tanto, los ejemplos de otros virus del dengue o flavivirus incluyen, pero no están limitados a, secuencias del virus del dengue-1, virus del dengue-3, virus del dengue-4, virus del Nilo Occidental, virus de la encefalitis japonesa, virus de la encefalitis de St. Louis, virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, virus de la fiebre amarilla y cualquier combinación de los mismos.

60 Como se emplea en el presente documento, "quimera de ácido nucleico" puede significar una construcción de la invención que comprende un ácido nucleico que comprende una porción de la secuencia de nucleótidos de un virus del dengue-2 y adicionalmente una secuencia de nucleótidos que no es del mismo origen que la secuencia de nucleótidos del virus del dengue-2. De forma correspondiente, cualquier flavivirus químico o flavivirus quimera divulgado en el presente documento puede ser reconocido como un ejemplo de quimera de ácido nucleico.

Como se emplea en el presente documento, "un virus vivo atenuado" puede significar un virus de tipo salvaje, mutado o seleccionado por rasgos de uso en vacunas o en otras composiciones inmunogénicas en donde algunos rasgos pueden incluir virulencia reducida, seguridad, eficacia o crecimiento mejorado, etc.

5 Descripción

En las siguientes secciones se describen varias composiciones y métodos ilustrativos con el fin de detallar varias realizaciones. Será obvio para aquella persona especializada en la técnica, que la puesta en práctica de las diferentes realizaciones no se requiere del uso de todos o siquiera algunos de los detalles específicos esbozados en el presente documento, más bien, las concentraciones, tiempos y otros detalles específicos pueden ser modificados a través de la experimentación rutinaria. En algunos casos, los métodos o componentes bien conocidos no se han incluido en la descripción.

Según las realizaciones de la presente divulgación, se pueden emplear técnicas convencionales de biología molecular, química de proteínas, microbiología y ADN recombinante dentro del conocimiento práctico de la técnica. Tales técnicas se explican de forma detallada en la bibliografía. Véanse, p. ej., Sambrook, Fritsch y Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2^a edición 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor, N.Y.; *Animal Cell Culture*, R.I. Freshney, ed.; 1986).

20 Las realizaciones del presente documento conciernen a composiciones, métodos y usos para inducir respuestas inmunitarias contra uno o más serotipos del virus del dengue en un sujeto, individualmente o simultáneamente. De acuerdo con estas realizaciones, los virus del dengue atenuados y las quimeras de ácido nucleico se generan y utilizan en composiciones de vacunas divulgadas en el presente documento. Algunas realizaciones se refieren a construcciones o quimeras del dengue modificadas o mutadas. Otras realizaciones 25 se refieren a la introducción de mutaciones para modificar las secuencias de aminoácidos de proteínas estructurales de los virus del dengue, en donde la mutación aumenta la inmunogenicidad del virus.

Los virus del dengue vivos atenuados de los cuatro serotipos se han desarrollado pasando virus de tipo salvaje en cultivo de células. Estos son algunos de los candidatos a vacunas vivos atenuados más prometedores para 30 la inmunización contra flavivirus y en particular contra la infección y/o enfermedad por el virus del dengue. Estos candidatos a vacunas se han designado por una combinación de su serotipo del dengue, la línea celular a través de la cual han sido pasados y el número de veces que han sido pasados. De esta forma, un virus del dengue de serotipo 1 de tipo salvaje pasado en células PDK 13 veces se designa como virus DEN-1 PDK-13. Otros candidatos a vacunas son DEN-2 PDK-53, DEN-3 PGMK-30/FRhL-3 (p. ej., treinta pases en células 35 primarias de riñón de mono verde, seguido de tres pases en células de pulmón de fetos Rhesus y DEN-4 PDK-48). Estos cuatro virus, candidatos a vacunas, se obtuvieron mediante pases en cultivo de tejidos de los virus de tipo salvaje progenitores DEN-1 16007, DEN-2 16681, DEN-3 16562 y DEN-4 1036, respectivamente.

40 En ciertas realizaciones, la vacuna del virus del dengue-2 vivo atenuado PDK-53 contiene una mezcla de virus cuya población contiene diferencias variadas en los nucleótidos. Después de una caracterización genética de las mutaciones atenuantes, se esbozaron ciertas características atenuantes y se diseñó un clon infeccioso de ADNc. El ARN se transcribió de este clon infeccioso y se introdujo en células Vero como un pase 1 del virus PDK-53-Vero-DEN-2-P1 recién caracterizado y obtenido (véase por ejemplo la Tabla 1). Este virus atenuado fue creado para cada serotipo DEN, pero para DEN-1, DEN-3 y DEN-4 se modificaron mediante ingeniería 45 genética los genes prM y E en 3 clones infecciosos de ADNc separados, generando así cuatro virus PDK-53-Vero separados (denominados en el presente documento: PDK-53-Vero-DEN-2-P 1, PDK-53-Vero-DEN-1-P 1, PDK-53-Vero-DEN-3-P 1 y PDK-53-Vero-DEN-4-P 1). Estas cepas de virus de vacuna atenuado fueron pasadas en células Vero 10 veces (Tabla 1) y cada uno de los linajes separados adquirió mutaciones ante su adaptación para poder crecer en células Vero (Tabla 3). Ciertas realizaciones aquí se dirigen a la obtención y 50 usos de estos virus del dengue vivos atenuados.

Ensayos clínicos previos en seres humanos, con estos virus atenuados, han indicado que DEN-2 PDK-53 tiene la menor dosis infecciosa (50% de dosis mínima infecciosa de 5 unidades formadoras de placa o UFP) en seres 55 humanos, es fuertemente inmunogénico y no produce aparentemente preocupaciones de seguridad. Los virus candidatos a vacunas DEN-1 PDK-13, DEN-3 PGMK-30/FRhL-3 y DEN-4 PDK-48 tienen dosis mínimas infecciosas mayores que 50% de 10.000, 3.500 y 150 UFP, respectivamente, en seres humanos. Aunque solo se requirió una inmunización con el virus DEN-2 PDK-53 monovalente o con el virus DEN-4 PDK-48 para conseguir 100% de seroconversión en sujetos humanos, se requirió un refuerzo para conseguir la misma tasa de seroconversión para los virus DEN-1 PDK-13 y DEN-3 PGMK-30/FRhL-3, los cuales tienen las dos dosis 60 infecciosas más elevadas para seres humanos.

El virus candidato a vacuna DEN-2 PDK-53, también abreviado PDK-53, tiene varios marcadores biológicos medibles asociados con la atenuación, incluyendo la sensibilidad a la temperatura, un tamaño pequeño de placa, disminución de replicación en cultivos de células de mosquito C6136, disminución de la replicación en mosquitos intactos, pérdida de neurovirulencia en ratones lactantes y disminución de la incidencia de viremia en monos. Las pruebas clínicas del candidato a vacuna de PDK-53 ha demostrado su seguridad e

inmunogenicidad en seres humanos. Además, la vacuna PDK-53 induce respuestas de células T de memoria específicas del virus del dengue receptores de la vacuna humanos. Algunas realizaciones en el presente documento describen una mejora en el DEN-2 PDK-53 utilizado en construcciones químicas divulgadas en el presente documento.

5 Se pueden utilizar quimeras inmunogénicas de flavivirus que tienen una cadena principal de virus del dengue-2 y al menos una proteína estructural de otro serotipo de virus del dengue para preparar las quimeras del virus del dengue y se describen los métodos para producir las quimeras del virus del dengue. Se proporcionan quimeras de virus del dengue inmunogénicas solas o combinadas en un portador farmacéuticamente aceptable como una
10 composición inmunogénica para minimizar, inhibir o inmunizar individuos contra la infección por uno o más serotipos, tales como los serotipos DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4 del virus del dengue, solos o combinados. Cuando se combinan, las quimeras del virus del dengue inmunogénicas se pueden utilizar como vacunas multivalentes (p. ej., bi-, tri- y tetravalentes) para conferir una protección simultánea en contra de la infección por más de una especie o cepa de flavivirus. En ciertas realizaciones, las quimeras del virus del dengue se combinan
15 en una composición inmunogénica útil como vacuna bivalente, trivalente o tetravalente contra los serotipos conocidos de virus del dengue o confieren inmunidad a otros flavivirus patógenos al incluir ácidos nucleicos que codifican una o más proteínas de un flavivirus diferente.

20 En algunas realizaciones, las quimeras inmunogénicas avirulentas de virus del dengue proporcionadas en el presente documento contienen genes de proteínas no estructurales de virus del dengue-2 atenuado (p. ej., PDK-53), o su equivalente, y uno o más genes de proteínas estructurales o porciones inmunogénicas de los mismos de flavivirus contra el cual se inducirá la inmunogenicidad en el sujeto. Por ejemplo, algunas realizaciones se refieren a una quimera que tiene un genoma atenuado de virus del dengue-2 PDK-53 como una cadena principal viral y uno o más genes de proteínas estructurales que codifican la cápside,
25 premembrana/membrana o envoltura del genoma de PDK-53 o combinaciones de los mismos, reemplazados por uno o más genes de proteínas estructurales correspondientes de DEN-1, DEN-3 o DEN-4 u otro flavivirus contra el cual se busca protección, tales como diferentes flavivirus o un serotipo de virus del dengue diferente. De acuerdo con estas realizaciones una quimera de ácido nucleico divulgada en el presente documento puede tener propiedades funcionales del virus del dengue-2 atenuado y ser avirulenta, pero expresa epitopos
30 antigenicos de los productos génicos estructurales de DEN-1, DEN-3 o DEN-4 además de otros flavivirus y ser inmunogénica (p. ej., induce una respuesta inmunitaria a los productos del gen en un sujeto). En ese caso estas construcciones de ADN se emplean para transcribir el ARN de un clon infeccioso, este ARN es introducido de nuevo en células Vero produciendo una nueva progenie de virus P1. Estos virus de la nueva progenie se distinguen de PDK-53. (Véase, p. ej., P1-P10).

35 5 En otra realización una quimera de ácido nucleico puede ser una quimera de ácido nucleico que tenga, pero no se limite a, una primera secuencia de nucleótidos que codifique proteínas no estructurales de un virus del dengue-2 atenuado y una segunda secuencia de nucleótidos que codifique una proteína estructural del virus del dengue-4 sola o combinada con otro flavivirus. En otras realizaciones, el virus del dengue-2 atenuado puede ser una cepa de vacuna PDK-53 que tenga uno o más aminoácidos mutados (véanse los Ejemplos). Estas mutaciones adicionales confieren rasgos deseables de uso como dengue-2 vivo atenuado o como construcciones químicas descritas en el presente documento. Algunas realizaciones incluyen proteínas estructurales de una o más proteínas C, prM o E de un segundo virus del dengue.
40

45 Otros aspectos incluyen virus químicos que pueden incluir sustituciones, delecciones o inserciones de nucleótidos y aminoácidos, por ejemplo, en el genoma de dengue-2 PDK-53 de control, para reducir la interferencia con respuestas de inmunogenicidad a un serotipo de virus del dengue elegido como diana. Estas modificaciones se pueden realizar en proteínas estructurales y no estructurales solas o combinadas con las modificaciones ilustrativas divulgadas en el presente documento y pueden generarse pasando el virus atenuado y obteniendo una composición mejorada para inducir una respuesta inmunitaria contra uno o más serotipos de virus del dengue.
50

55 Ciertas realizaciones divulgadas en el presente documento, proporcionan un método para preparar los virus químicos utilizando técnicas recombinantes, insertando las sustituciones requeridas en el genoma con la cadena principal apropiada. Otras realizaciones del presente documento tienen que ver con el pase de un virus químico atenuado vivo confirmado (p. ej., seguro y eficaz) para mejoras adicionales. En ciertas realizaciones, una cadena principal de virus del dengue-2, utilizada en el presente documento, puede incluir una o más mutaciones presentadas en la Tabla 3. En otras realizaciones, una quimera dengue-dengue de la presente solicitud puede incluir una o más mutaciones como las presentadas en la Tabla 3. En otras realizaciones más, una quimera dengue-dengue puede incluir todas las mutaciones para cada quimera representadas en la Tabla 3 para Den-2/Den-1, Den-2/Den-3 o Den-2/Den-4. Se contemplan las composiciones farmacéuticas que incluyen un virus vivo atenuado representado por las construcciones de la Tabla 3. Por ejemplo, se contemplan composiciones, mono-
60 di-, tri- o tetravalentes para su uso en el presente documento empleando quimeras y virus del dengue-2 vivos atenuados como los presentados en la Tabla 3.

65 En ciertas realizaciones se puede formular una variante de DEN-2 vivo atenuado contemplada en el presente

documento en una composición farmacéutica, en donde la composición farmacéutica se puede administrar sola o combinada con quimeras dengue-dengue o quimeras dengue-flavivirus. En ciertas realizaciones, se pueden administrar composiciones bi-, tri- o tetravalentes en una única aplicación o en múltiples aplicaciones a un sujeto.

5

Quimeras de flavivirus

Los virus del dengue tipos 1-4 (DEN-1 a DEN-4) son flavivirus patógenos transmitidos por mosquitos. El genoma del flavivirus contiene una región 5'-no codificante (5'-NC), seguida de una región codificante de la proteína de la cápside (C), seguida de una región codificante de la proteína premembrana/membrana (prM), seguida de una región codificante de la proteína de la envoltura E, seguida de una región codificante de proteínas no estructurales (NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5) y finalmente una región 3'-no codificante (3'-NC). Las proteínas estructurales virales son C, prM y E, y las proteínas no estructurales son NS1-NS5. Las proteínas estructurales y no estructurales se traducen como una única poliproteína y son procesadas por proteasas celulares y virales.

Las quimeras de flavivirus pueden ser construcciones formadas por la fusión de genes de proteínas no estructurales de un tipo, o serotipo de virus del dengue o especie de virus de flaviviridae, con genes de proteínas, por ejemplo, genes de proteínas estructurales, de un tipo diferente, o serotipo, de virus del dengue o especie de virus de flaviviridae. De forma alternativa una quimera de flavivirus de la divulgación es una construcción formada por la fusión de genes de proteínas no estructurales de un tipo, o serotipo, de virus del dengue o especies de virus de flaviviridae, con secuencias de nucleótido adicionales que dirigen la síntesis de polipéptidos o proteínas seleccionados entre otros serotipos de virus del dengue u otros virus flaviviridae.

25 En otras realizaciones, las quimeras de flavivirus inmunogénicas, avirulentas proporcionadas en el presente documento contienen genes de proteínas no estructurales de virus del dengue-2 atenuado o equivalentes del mismo, y uno o más de los genes de proteínas estructurales o porciones antigenicas de los mismos, de flavivirus contra los cuales se conferirá inmunogenicidad. Los flavivirus adecuados incluyen, pero no se limitan a, aquellos enumerados en la Tabla 1.

30 Otros virus del dengue adecuados para su uso en la construcción de quimeras pueden ser DEN-1 16007, DEN-2 16681, DEN-3 16562 y DEN-4 1036 virulentos de tipo salvaje y las cepas de vacunas atenuadas DEN-1 PDK-13, DEN-2 PDK-53, DEN-3 PMK-30/FRHL-3 y DEN-4 PDK-48. Las diferencias genéticas entre los pares de virus DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4 de tipo salvaje/atenuados se contemplan junto con cambios en las 35 secuencias de aminoácidos codificadas por los genomas virales.

40 Las listas de secuencias para DEN-2 PDK-53 corresponden a la variante DEN-2 PDK-53-V, en donde la posición del nucleótido 5270 del genoma se muta de A a T y la posición de aminoácido 1725 de la poliproteína o la posición del aminoácido 250 de la proteína NS3 contiene un resto de valina. La variante DEN-2 PDK-53 sin mutación de nucleótido, DEN-2 PDK-53-E, difiere de PDK-53-V solo en esta posición. DEN-2 PDK-53-E tiene una A en la posición de nucleótido 5270 y un glutamato en la posición de aminoácido 1725 en la poliproteína, la posición de aminoácido 250 en la proteína NS3. Se entiende que las realizaciones del presente documento incluyen PDK 53 modificada que incluyen uno o más pasos en una célula anfitriona separada (p. ej., células Vero, véase la Tabla 1) donde se generan los rasgos deseables para el uso en composiciones de 45 vacunas contempladas en el presente documento.

50 En ciertas realizaciones, la designación de las quimeras puede basarse en las cadenas principales modificadas de clones infecciosos específicos de virus DEN-2 e insertos de genes estructurales (prM-E o C-prM-E) de otros virus del dengue u otros flavivirus. DEN-2 para la cadena principal del dengue-2, seguido por la cepa de la cual se insertan los genes estructurales. Una variante de cadena principal de DEN-2 se refleja en la siguiente letra después de la designación del número. Una variante de la cadena principal de DEN-2, en particular, a partir de la cual se construyó una quimera, se indica por la siguiente letra que sigue al guion, progenitor 16681 (P), PDK-53-E (E), o PDK-53-V (V); la última letra indica los genes estructurales C-prM-E de la cepa progenitora (P) o su vacuna derivada (V) o los genes estructurales prM-E del progenitor (P) o de su vacuna derivada (V1). Por ejemplo; DEN-2/1-VP denota una quimera que comprende la cadena principal de DEN-2 PDK-53V atenuada que comprende una valina en NS3-250 y los genes C-prM-E de DEN-1 16007 de tipo salvaje; DEN-2/1-VV denota la cadena principal DEN-2 PDK-53V con la cepa de vacuna del dengue-1, DEN-1 PDK-13; DEN-2/1-VP1 denota la cadena principal DEN-2 PDK-53V y los genes prM-E de DEN-1 16007 de tipo salvaje; DEN-2/3-VP1 denota la cadena principal DEN-2 PDK-53V y los genes prM-E de DEN-3 16562 de tipo salvaje; DEN-60 2/4VP1 denota la cadena principal DEN-2 PDK-53V con genes prM-E DEN-4 1036 de tipo salvaje. De la misma manera se indican otras quimeras divulgadas en el presente documento.

65 En una realización, las quimeras divulgadas en el presente documento contienen el genoma del virus PDK-53 del dengue-2 atenuado como cadena principal viral, en donde los genes de las proteínas estructurales que codifican las proteínas C, prM y E del genoma de PDK-53 o combinaciones de los mismos, se pueden reemplazar por los correspondientes genes de proteínas estructurales de virus del dengue-1, dengue-3 o

dengue-4 y opcionalmente, otro flavivirus contra el que se quiera proteger, tal como un flavivirus diferente o una cepa de virus del dengue diferente.

En las regiones de proteínas no estructurales, se descubrió una mutación de Gly a Asp (de tipo salvaje a PDK-53) en una proteína no estructural NS1-53 (posición de nucleótido 2579 del genoma); se descubrió una mutación Leu a Phe (de tipo salvaje a PDK-53) en la proteína no estructural NS2A-181 (posición de nucleótido 4018 del genoma); se descubrió una mutación Glu a Val (de tipo salvaje a PDK-53) en la proteína no estructural NS3-250 (posición de nucleótido 5270 del genoma) y se descubrió una mutación Gly a Ala (de tipo salvaje a PDK-53) en la proteína no estructural NS4A-75 (posición de nucleótido 6599 del genoma). El virus DEN-2 vivo atenuado de la presente divulgación incluye adicionalmente mutaciones como las presentadas en cualquier quimera o virus de dengue-2 vivo atenuado de la Tabla 3.

La cepa PDK-53 tiene un genotipo mixto en el nucleótido 5270 del genoma. Una porción significativa (aproximadamente 29%) de la población de virus codifica NS3-250-Glu no mutada que está presente en el virus DEN-2 16681 de tipo salvaje en lugar de la mutación NS3-250-Val. Como ambas variantes genéticas son avirulentas, esta mutación puede no ser necesaria en una quimera avirulenta.

Previamente se descubrió que la avirulencia de la cepa de virus PDK-53 atenuado puede atribuirse a mutaciones en la secuencia de nucleótidos que codifica las proteínas no estructurales y en la región 5'-no codificante. Por ejemplo, una única mutación en NS1-53, una doble mutación en NS1-53 y 5'NC-57, una doble mutación en NS1-53 y en NS3-250 y una triple mutación en NS1-53, en 5'NC-57 y en NS3-250, dan como resultado la atenuación del virus DEN-2. Por lo tanto, el genoma de cualquier virus de dengue-2 que contenga tales sustituciones de aminoácido o sustituciones de nucleótidos no conservativas puede utilizarse como una secuencia base para obtener los virus PDK-53 modificados divulgados en el presente documento. Otra mutación en el tallo de la estructura tallo-bucle de la región 5'-no codificante proporcionará estabilidad adicional al fenotipo avirulento si se desea. Las mutaciones en esta región interrumpen potenciales estructuras secundarias importantes para la replicación viral. Una única mutación en esta pequeña estructura del tallo (solo tiene 6 restos de nucleótidos de longitud) tanto en los virus DEN como en los de encefalitis equina de Venezuela altera la formación de la estructura de horquilla. Otras mutaciones en esta estructura del tallo disminuyen la posibilidad de la reversión en este locus, mientras que mantienen la viabilidad del virus.

Las mutaciones divulgadas en el presente documento pueden lograrse mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, clones de origen natural o seleccionados que poseen características adicionales una vez que se pasan en la línea celular de interés (p. ej., células Vero). Los expertos en la técnica entienden que se pueden utilizar los ensayos de escrutinio de virulencia, como los descritos en el presente documento y como los son bien conocidos en la técnica, para distinguir entre estructuras de cadenas principales virulentas y avirulentas.

Construcción de Quimeras de Flavivirus.

Las quimeras de flavivirus descritas en el presente documento pueden producirse por empalme de uno o más genes de proteínas estructurales de los flavivirus en contra de los cuales se desea inmunidad en una cadena principal de genoma de virus del dengue PDK-53 o por otros métodos conocidos en la técnica, utilizando ingeniería recombinante para eliminar el gen PDK-53 correspondiente y reemplazarlo por un gen del virus de dengue-1, dengue-3 o dengue-4 u otro gen conocido en la técnica.

De forma alternativa, utilizando las secuencias proporcionadas en la lista de secuencias, las moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas del flavivirus pueden sintetizarse empleando técnicas de síntesis de ácidos nucleicos conocidas e insertarse en el vector apropiado. Por lo tanto, se producirá un virus avirulento inmunogénico utilizando mecanismos de ingeniería recombinante conocidos por los expertos en la técnica.

Se puede insertar un gen diana en la cadena principal que codifica una proteína estructural de flavivirus de interés para DEN-1, DEN-3, DEN-4 u otro flavivirus. El gen de flavivirus que se va a insertar puede ser un gen que codifica una proteína C, una proteína PrM y/o una proteína E. La secuencia insertada en la cadena principal de dengue-2 puede codificar ambas proteínas estructurales PrM y E. La secuencia insertada en la cadena principal de dengue-2 puede codificar todas o una de las proteínas estructurales C, prM y E.

Los virus químéricos o quimeras de ácido nucleico adecuados que contienen secuencias de nucleótidos que codifican proteínas estructurales de otros flavivirus o serotipos de virus del dengue pueden evaluarse por su utilidad como vacunas escrutándolos para determinar los marcadores fenotípicos de atenuación anteriores que indican avirulencia y escrutándolos para determinar su inmunogenicidad. La antigenicidad e inmunogenicidad puede evaluarse empleando reactividades *in vitro* o *in vivo* con anticuerpos de flavivirus o suero inmunoreactivo, empleando procedimientos de escrutinio rutinarios conocidos por los expertos en la técnica.

Vacunas contra el Virus del Dengue

En ciertas realizaciones, los virus químéricos y las quimeras de ácido nucleico pueden proporcionar virus vivos atenuados útiles como inmunógenos o vacunas. Algunas realizaciones incluyen quimeras que exhiben alta inmunogenicidad al virus del dengue-4 sin producir efectos patógenos peligrosos o letales.

- 5 Para reducir la aparición de FHD/SCD en sujetos, se necesita una vacuna tetravalente para proporcionar inmunidad simultánea a los cuatro serotipos del virus. Una vacuna tetravalente se produce combinando un virus del dengue-2 vivo atenuado de la presente solicitud, con quimeras de dengue-2/1, dengue-2/3 y dengue-2/4 descritas previamente en un portador farmacéutico adecuado para su administración como una vacuna multivalente.

10 Los virus químéricos o quimeras de ácido nucleico de esta divulgación pueden incluir genes estructurales de tipo salvaje o virus vivos, atenuados en una cadena principal de virus DEN-2 virulento o atenuado. Por ejemplo, la quimera puede expresar los genes de la proteína estructural del virus DEN-4 1036 de tipo salvaje, su derivado candidato a vacuna de cualquier origen en DEN-2.

15 Los virus utilizados en las quimeras divulgadas en el presente documento pueden cultivarse empleando mecanismos conocidos en la técnica. Las placas virales se titulan y se cuentan con el fin de verificar la viabilidad y características del fenotipo de los cultivos en crecimiento. Los virus de tipo salvaje pueden pasarse por las líneas celulares cultivadas para obtener materiales de partida candidatos atenuados.

20 Se pueden construir clones de infecciosos químéricos a partir de varios clones de serotipos de dengue disponibles. También se puede completar la clonación de fragmentos de ADNc específicos al virus, si se desean. Los fragmentos de ADNc que contienen los genes de las proteínas estructurales o no estructurales se amplifican empleando una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) a partir de ARN de virus del dengue con diversos cebadores. Los fragmentos amplificados se clonian en los sitios de escisión de otros clones intermedios. Los clones intermedios de virus del dengue químéricos se secuencian a continuación, para verificar la precisión del ADNc específico del virus del dengue insertado.

25 Los plásmidos químéricos con genoma de longitud completa, construidos mediante la inserción de la región del gene de la proteína estructural y/o no estructural de los virus de serotipo del dengue en vectores, se pueden obtener empleando mecanismos recombinantes que son bien conocidos por los especialistas en la técnica.

Análisis de Nucleótidos y Aminoácidos

30 La mutación NS1-53 en el virus de la vacuna DEN-2 PDK-53 es significativa para el fenotipo atenuado de este virus, debido a que NS1-53-Gly del virus DEN-2 16681 se conserva en casi todos los flavivirus, incluyendo los virus transmitidos por garrapatas, secuenciados hasta la fecha. El virus de la vacuna DEN-4 puede también contener una mutación de aminoácido en la proteína NS1 en la posición 253. Este locus, que es una mutación Gln a His en el virus de vacuna DEN-4 PDK-48 es Gln en los cuatro serotipos salvajes del virus del dengue.

35 Este resto Gln es único para los virus del dengue dentro del género flavivirus. La proteína NS1 es una glicoproteína que se es secretada a partir de las células infectadas con flavivirus. Está presente sobre la superficie de la célula infectada y se encuentran anticuerpos específicos contra NS1 en el suero de individuos infectados con el virus. Se ha informado de la protección de animales inmunizados con la proteína NS1 o pasivamente con un anticuerpo específico para NS1. La proteína NS1 parece participar en la replicación viral temprana del ARN.

40 Las mutaciones que se produjeron en las proteínas NS2A, NS2B, NS4A y NS4B de las cepas DEN-1, -2, -3 y -4 atenuadas son de naturaleza conservativa. Las mutaciones NS4A-75 y NS4A-95 de los virus de las vacunas DEN-2 y DEN-4, respectivamente, se produjeron en sitios de conservación de aminoácidos entre los virus del dengue, pero no entre los flavivirus en general.

45 La proteína flaviviral NS3 posee al menos dos funciones reconocidas: la proteinasa viral y la ARN helicasa/NTPasa. La proteína NS3 de 698 aa de longitud (virus DEN-2) contiene un dominio de serina proteasa amino terminal (triada catalítica NS3-51-His, -75-Asp, -135-Ser) seguida por motivos en la secuencia de funciones ARN helicasa/NTPasa (NS3-196-GAGKT (SEQ ID NO:147), -284-DEAH, -459-GRIGR). Ninguna de las mutaciones en las proteínas NS3 de los virus DEN-1, DEN-2 o DEN-3 se produjo en un motivo reconocido. La mutación Tyr a Phe en NS3-510 en el virus DEN-1 PDK-13 fue conservativa. Puesto que los virus DEN-2, -3 y -4 de tipo salvaje contienen Phe en esta posición, es poco probable que la mutación Tyr a Phe juegue un papel en la atenuación del virus DEN-1. La mutación Glu a Lys en NS3-182 en DEN-1 PDK-13 se produjo en una posición que está conservada como Asp o Glu en la mayoría de los flavivirus transmitidos por mosquito y puede jugar un papel en la atenuación. Esta mutación se localizó 15 restos de aminoácidos aguas arriba del motivo helicasa GAGKT. Como se ha señalado en informes previos, NS3-250-Glu en el virus DEN-2 16681 se conserva en todos los flavivirus transmitidos por mosquitos excepto en el virus de la fiebre amarilla.

50 65 Las sondas de ácido nucleico hibridan selectivamente con las moléculas de ácido nucleico que codifican los virus DEN-1, DEN-3 y DEN-4 o secuencias complementarias de los mismos. En término "selectivamente" o

"selectivo" se refiere a una secuencia que no hibrida con otros ácidos nucleicos evitando la adecuada detección del virus del dengue. Por lo tanto, en el diseño de los ácidos nucleicos que hibridan, la selectividad dependerá de otros componentes presentes en una muestra. El ácido nucleico que hibrida debe de tener al menos 70% de complementariedad con el segmento de ácido nucleico con el cual hibrida. Como se emplea en el presente

5 documento para describir ácidos nucleicos, el término "hibrida selectivamente" excluye la hibridación ocasional aleatoria de los ácidos nucleicos y por lo tanto tiene el mismo significado que "hibrida específicamente". El ácido nucleico que hibrida selectivamente en esta divulgación puede tener al menos 70%, 80%, 85%, 90%, 10 95%, 97%, 98% y 99% de complementariedad con el segmento de la secuencia con la cual hibrida, preferiblemente 85% o más.

10 Se contemplan secuencias, sondas y cebadores que hibridan selectivamente con el ácido nucleico codificante o la hebra del ácido nucleico complementaria u opuesta. La hibridación específica con un ácido nucleico puede ocurrir con modificaciones menores o sustituciones en el ácido nucleico, siempre y cuando se mantenga la capacidad funcional de hibridación específica de la especie. Por "sonda" se entienden secuencias de ácido 15 nucleico que puede ser utilizada como sondas o cebadores para la hibridación selectiva con secuencias complementarias de ácido nucleico para su detección o amplificación, la longitud de cuyas sondas puede variar de aproximadamente 5 a 100 nucleótidos o preferiblemente de aproximadamente 10 a 50 nucleótidos, o lo más preferiblemente de aproximadamente 18 a 24 nucleótidos.

20 Si se utiliza como cebador, la composición preferiblemente incluye al menos dos moléculas de ácido nucleico que hibridan con diferentes regiones de la molécula diana con el fin de amplificar una región deseada. Dependiendo de la longitud de la sonda o del cebador, la región diana puede variar de 70% de bases complementaria hasta la complementariedad completa y aún hibridar bajo condiciones rigurosas. Por ejemplo, con el objeto de detectar la 25 presencia del virus del dengue, el grado de complementariedad entre el ácido nucleico que hibrida (sonda o cebador) y la secuencia con la cual hibrida es al menos suficiente para distinguir la hibridación con el ácido nucleico de otros organismos.

30 Las secuencias del ácido nucleico que codifican del virus DEN-4, DEN-3 o DEN-1 (p. ej., elementos estructurales) pueden insertarse en un vector, tal como un plásmido y ser expresadas recombinantemente en un organismo vivo (p. ej., en una cadena principal de dengue-2) para producir péptidos y/o polipéptidos y/o virus de virus del dengue recombinante. Métodos para la Detección de Ácidos Nucleicos.

35 En la presente divulgación se proporcionar una prueba genética rápida que es un diagnóstico para cada uno de los virus de vacuna descritos en el presente documento. Esta realización mejora los análisis de virus aislados del suero de seres humanos vacunados que han desarrollado viremia y también mejora la caracterización de la viremia en primates no humanos inmunizados con los virus candidatos a vacunas.

40 Estas secuencias incluyen una sonda de diagnóstico TaqMan que sirve para informar de la detección del amplicón de ADNc amplificado a partir del molde de ARN genómico viral, empleando una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT/PCR), así como los amplímeros directo e inverso que se han diseñado para amplificar el amplicón de ADNc, como se describe a continuación. En ciertos casos, uno de los 45 amplímeros se ha diseñado para contener una mutación específica del virus de vacuna en el extremo terminal 3' del amplímero, que logra con eficacia que la prueba sea más específica para la cepa de vacuna debido a la extensión del cebador en el sitio diana, y por consiguiente la amplificación ocurrirá solo si el molde de ARN viral contiene esa mutación específica.

50 Se pueden emplear los sistemas de detección de secuencias de ácidos nucleicos basados en PCR automatizada u otra tecnología conocida para la detección de ácidos nucleicos. El ensayo TaqMan es un ensayo altamente específico y sensible que permite una visualización y cuantificación en tiempo real 55 automatizada de los amplicones generados por PCR de un molde de ácido nucleico muestra. TaqMan puede determinar la presencia o ausencia de una secuencia específica. En este ensayo se diseña un cebador directo e inverso para la reasociación aguas arriba y aguas abajo del sitio de mutación diana, respectivamente. Una sonda de detección específica, que está diseñada para tener una temperatura de fusión de aproximadamente 10°C más elevada que cualquiera de los amplímeros y que contiene la mutación del nucleótido, específica del virus de vacuna o su complemento (dependiendo de la hebra del amplicón de RT/PCR que se está detectando) constituye el tercer componente cebador de este ensayo.

60 Una sonda diseñada para detectar específicamente un locus mutado en uno de los genomas virales de vacuna contendrá el nucleótido específico de vacuna en la mitad de la sonda. Esta sonda dará como resultado una fluorescencia detectable en el ensayo TaqMan si el molde de ARN viral es específico del virus de vacuna. Sin embargo, los moldes de ARN genómico de los virus DEN de tipo salvaje, tendrán una menor eficacia de 65 hibridación con sonda debido al emparejamiento erróneo de un solo nucleótido (en el caso de los virus DEN progenitores) o posiblemente más de un emparejamiento erróneo (como puede ocurrir en otros virus DEN de tipo salvaje) y no proporcionará como resultado una fluorescencia significativa. Es más probable que la ADN polimerasa desplace una sonda con emparejamiento erróneo del molde de amplicón RT/PCR que escinda la sonda con emparejamiento erróneo para liberar el colorante informador (Ensayo de discriminación alélica

TaqMan, Applied Biosystems)

Una estrategia para diagnosticar pruebas genéticas emplea balizas moleculares. La estrategia de las balizas moleculares también emplea los cebadores para la amplificación mediante RT/PCR de los amplicones y la

- 5 detección de una secuencia específica dentro del amplicón mediante una sonda que contienen colorantes informador y extintor en los extremos de la sonda. En este ensayo la sonda forma una estructura tallo-bucle. Los ensayos de balizas moleculares emplean colorante extintor e informador que difieren de los que utiliza el ensayo TaqMan.

10 Composiciones farmacéuticas

Las realizaciones del presente documento proporcionan la administración de composiciones a sujetos en una forma biológicamente compatible y adecuada para administración farmacéutica *in vivo*. Por "forma biológicamente compatible adecuada para administración *in vivo*" se entiende una forma del agente activo (p.

- 15 ej., un producto químico farmacéutico, proteína, gen de las realizaciones) que se administrara, en la cual cualquier efecto tóxico es superado por el efecto terapéutico del agente activo. La administración de una cantidad terapéuticamente activa de las composiciones terapéuticas se define como una cantidad eficaz, a las dosificaciones, por períodos de tiempo necesarios para lograr el resultado deseado. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente activa de un compuesto puede variar de acuerdo con factores tales como estado de la
- 20 enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo y la capacidad del anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el individuo. El régimen de dosificación puede ser ajustado para proporcionar una respuesta terapéutica óptima.

- 25 En una realización, el compuesto (p. ej., el producto químico farmacéutico, proteína, péptido, etc. de las realizaciones) puede ser administrado de una forma conveniente, por ejemplo, administración subcutánea, intravenosa, mediante administración oral, inhalación, intradérmica, por aplicación transdérmica, aplicación intravaginal, aplicación tópica, intranasal o rectal. Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo puede estar contenido en un tampón protector (p. ej., FTA, F127/trehalosa/albúmina). En una realización, una composición puede ser administrada oralmente. En otra realización, la composición puede ser administrada intravenosamente. En una realización, la composición puede ser administrada por vía intranasal, por ejemplo, mediante inhalación. En otra realización más, la composición puede ser administrada por vía intradérmica empleando un sistema libre de agujas (p. ej., Pharmajet ®) u otro sistema de administración intradérmica.

- 30 Una composición puede administrarse a un individuo en un portador o diluyente apropiado, administrada conjuntamente con inhibidores enzimáticos o en un portador apropiado tal como liposomas. Se pretende que el término "portador farmacéuticamente aceptable" como se emplea en el presente documento incluya diluyentes tales como soluciones salinas y soluciones acuosas tamponadoras. Puede ser necesario recubrir el compuesto con, o administrar conjuntamente el compuesto con un material que prevenga su inactivación. El agente activo puede también ser administrado por vía parenteral o intraperitoneal. Las dispersiones también
- 35 se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones pueden contener un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos u otra formulación estabilizante (p. ej., FTA).

- 40 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable pueden administrarse mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden utilizarse soluciones acuosas estériles (si son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles en el caso de preparaciones extemporáneas de soluciones inyectables estériles o dispersiones. En todos los casos, la composición puede ser estéril y puede ser fluida de tal forma que pueda inyectarse fácilmente. Puede ser estable bajo condiciones de fabricación, almacenamiento y puede preservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador farmacéuticamente
- 45 aceptable puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (p. ej., glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de recubrimientos tales como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula requerido, en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de microorganismos puede lograrse mediante el calentamiento, exponiendo el agente a un detergente, por
- 50 irradiación o añadiendo varios agentes antibacterianos o antifúngicos.

- 55 Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse al incorporar un compuesto activo (p. ej., un compuesto que induzca una respuesta inmunitaria a uno o más serotipos del virus del dengue) en la cantidad requerida, en el disolvente apropiado, con uno o una combinación de ingredientes enumerados previamente, como se requiera, seguido de esterilización por filtración.

- 60 Después de formularse, las soluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de la dosis y en una cantidad que resulte terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación, tales como el tipo de soluciones inyectables descritas anteriormente.
- 65 Se contempla que las composiciones sean especialmente adecuadas para administración intramuscular, subcutánea, intradérmica, intranasal e intraperitoneal. Se puede buscar una razón particular tal como 1:1, 1:2

u otra razón (p. ej., las UFP de un serotipo de virus del dengue dado)

Los agentes terapéuticamente activos se pueden formular dentro de una mezcla de proporciones predeterminadas. También se pueden administrar dosis sencillas o dosis múltiples bajo un programa apropiado

5 para una situación dada (p. ej., antes de viajar o en un brote de fiebre de dengue).

En otra realización, se pueden emplear soluciones o pulverizaciones, aerosoles o inhaladores nasales con el fin de suministrar el compuesto de interés. Existen formulaciones adicionales adecuadas para otros modos de administración, las cuales incluyen supositorios y pesarios.

10

Ciertas formulaciones pueden incluir excipientes, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio y similares.

Se puede preparar una composición farmacéutica empleando portadores que protejan los ingredientes activos

15

contra la rápida eliminación del organismo, tales como formulaciones o recubrimientos de liberación retardada. Tales portadores incluyen formulaciones de liberación controlada, tales como, pero no limitadas a sistemas de suministro microencapsulados, y polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como etileno acetato de vinilo, polianhídridos, polí(ácido glicólico), poliortoesteres, polí(ácido láctico) y otros conocidos.

20

Las composiciones farmacéuticas se administran en una cantidad y con una frecuencia que es eficaz para inhibir o para aliviar efectos secundarios de un trasplante y/o para reducir o prevenir el rechazo. La dosificación precisa y duración del tratamiento pueden ser determinadas de forma empírica empleando protocolos de prueba conocidos o probando las composiciones en sistemas modelo conocidos en la técnica y extrapolando. Las dosificaciones también pueden variar de acuerdo con la gravedad de la afección. Una composición

25

farmacéutica es generalmente formulada y administrada para ejercer un efecto terapéuticamente útil al tiempo que se minimizan los efectos secundarios no deseables. En general, se pueden administrar intervalos de dosis de 10^2 a 10^6 UFP de forma inicial y opcionalmente, seguido de una segunda administración dentro de los siguientes 30 días o 180 días, conforme sea requerido. En ciertas realizaciones, el sujeto puede recibir una administración dual de una composición mono-, bi-, tri- o tetravalente divulgada en el presente documento, en

30

donde la composición es una mezcla de composiciones únicas o tiene composiciones predeterminadas de diferentes serotipos de virus del dengue. En algunas realizaciones, una quimera DEN2/4 puede estar presente a mayores concentraciones que otros serotipos de virus del dengue, tales como el dengue-1 vivo atenuado.

Es evidente que, para cualquier sujeto en particular, los regímenes de dosificación específicos podrán ser

35

ajustados a lo largo del tiempo, de acuerdo a las necesidades individuales.

En una realización, una composición divulgada en el presente documento, puede ser administrada a un sujeto de forma subcutánea o intradérmica.

40

Las composiciones farmacéuticas que contienen virus del dengue vivos atenuados pueden administrarse a individuos, en particular seres humanos, por ejemplo, por vía subcutánea, intramuscular, intranasal, oral, tópica, transdérmica, parenteral, gastrointestinal, transbronquial y transalveolar. La administración tópica se logra a través una crema, gel, enjuague aplicados tópicamente, etc. que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de inhibidores de serina proteasas. La administración transdérmica se logra mediante la aplicación de una crema, enjuague, gel, etc. capaz de permitir que los inhibidores de serina proteasas penetren en la piel y entren en el torrente sanguíneo. Adicionalmente se pueden emplear bombas osmóticas para la administración. La dosificación necesaria variará con la afección particular que se vaya a tratar, el método de administración y la velocidad de aclaramiento de la molécula del organismo.

45

En ciertas realizaciones, el sujeto puede ser un mamífero, tal como un ser humano o un animal veterinario y/o doméstico o ganado o animal salvaje.

Métodos terapéuticos

50

En una realización, se contemplan en el presente documento métodos para inducir una respuesta inmunitaria a uno o varios serotipos del virus del dengue empleando una formulación mono-, bi-, tri o tetravalente de construcciones virales vivas atenuadas y/o químéricas.

Ejemplos

55

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar ciertas realizaciones presentadas en el presente documento. Los ejemplos que no se refieren a la construcción del dengue definida en las reivindicaciones tienen únicamente fines ilustrativos. Los expertos en la técnica deberán apreciar que los mecanismos divulgados en los ejemplos que siguen representan mecanismos que se ha descubierto que funcionan bien en las prácticas divulgadas en el presente documento, y por lo tanto se puede considerar que constituyen modos preferidos para su práctica.

Ejemplo 1

En algunos métodos ilustrativos se divultan composiciones empleadas para generar, lo que aquí se denomina "semillas de virus maestras (MVS). Estas composiciones se pueden obtener a partir de uno o más virus del dengue vivos atenuados, tales como DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4. En ciertos métodos, las composiciones se pueden obtener a partir de uno o más virus del Dengue vivos atenuados que incluyen, pero no están limitados a construcciones específicas divulgadas en el presente documento, referidas como DENVax-1, DENVax-2, DENVax-3 y DENVax-4. En otros métodos ilustrativos, se proporcionan estrategias para generar y caracterizar estas composiciones. En otras realizaciones más, se proporcionan formulaciones de virus del dengue tetravalentes y la caracterización genética y fenotípica de estas formulaciones.

Producción y análisis de virus DENVax pre-maestros

Se realizaron algunos procedimientos para generar semillas de virus del dengue pre-maestras, tales como la amplificación y purificación en serie de virus del dengue (p. ej., DENVax). En primer lugar, los virus DENVax se volvieron a obtener por transfección de ARN viral transrito a partir de ADNC de DENVax recombinante completo a células de producción certificada (p. ej., células Vero), dando como resultado la semilla de virus P1 (pase 1). Los cuatro virus P1 de cada uno de dengue-1 a dengue-4 fueron posteriormente amplificados y purificados en placa para obtener los candidatos de semillas de vacuna pre-maestra P7 (véase la Tabla 1). Se realizaron ciertas pruebas para analizar los pases de los virus del dengue. Por ejemplo, la secuenciación genómica completa demostró que las cuatro semillas de virus P2 (pase 2) eran genéticamente idénticas a su progenitor homólogo, un virus de vacuna candidato de grado de investigación obtenido para investigación. Los fenotipos de la placa original también se conservaron en los virus P2. Se aislaron seis virus purificados de las placas (A-F de P3) para cada serotipo del virus del dengue (p. ej., DENVax1-4) a partir de las semillas P2 y cada placa aislada fue directamente purificada de la placa dos veces más. La tercera purificación de las placas (P5) de cada virus se amplificó dos veces (A-F de P6 y A-F de P7) en células Vero para producir las semillas DENVax P7 pre-maestras potenciales (**Tabla 1**).

Tabla 1. Ejemplo de una nueva obtención de cGMP de los virus DENVax en células WCB-Vero

Pase	Producción de semillas / Purificación	Caracterizaciones
P1	Transfectar WCB-Vero con ARN virales transcritos	Titulación de placas
P2	Amplificar el virus P1.	Secuencia genómica completa
P3	Seleccionar 6 placas (A-F)/serotipo del ensayo P2 de placa.	Purificación de placas
P4	Seleccionar placas A-F del ensayo de placa P3	Purificación de placas
P5	Seleccionar placas A-F del ensayo de placa P4	Purificación de placas
P6	Amplificar las placas A-F de P5	Titulación de placas
P7	Semillas pre-maestras: amplificar A-F de P6	Secuencia genómica completa, TaqMAMA, fenotipos de placa
P8*	MVS: amplificar semillas de virus P7 seleccionadas	Caracterización genética y fenotípica completa
P9	WVS: amplificar virus semilla maestras P8.	Secuencia genómica completa, TaqMAMA
P10	BVS: amplificar virus semilla de trabajo P9.	Secuencia genómica completa, TaqMAMA

*Se seleccionó una semilla P7 óptima (A, B, C, D, E o F) basándose en la genética y el análisis de placa para producir MVS P8

Adicionalmente se realizaron otras pruebas para caracterizar las semillas DENVax P7, como un análisis de las secuencias del genoma y los fenotipos de placa de las semillas P7, y comparación con las semillas P2 (Tabla 2). Los fenotipos de placa de los virus P7 fueron generalmente similares a los de las semillas P2. En algunos experimentos ilustrativos, se verificaron los títulos de virus. Los títulos de virus alcanzaron hasta 6,0 log ufp/ml para la mayoría de las semillas P7, con excepción de 5 virus. La secuenciación del genoma de más de 60 semillas de virus candidatas a vacunas, después de 10 o más pases en serie en células Vero no mostraron eventos de reversión en NS1-53 y NS3-250 de los tres determinantes de atenuación principales del vector genético DENV-2 PDK-53, sugiriendo que estos 2 loci son bastante estables en las semillas de virus candidatas a vacunas. Todos los cromatogramas de secuencia de las 24 cepas candidatas generadas tanto a partir de secuenciación directa como inversa de estos dos sitios fueron homogéneos, sin la menor población evidente de nucleótidos en los locus genéticos NS1-53 y NS3-250. En contraste con los sitios NS1 y NS3, se identificaron diferentes niveles de reversión en los locus de atenuación 5'NCR-57 de los virus de vacuna de grado de investigación con múltiples pases de forma seriada, sugiriendo que este locus puede no ser tan estable como NS1 y NS3 después de pases múltiples en cultivos celulares. Por lo tanto, se desarrolló un ensayo de

amplificación sensible a emparejamientos erróneos (TaqMAMA) para medir adecuadamente la velocidad de reversión en el locus 5'NCR-57 mediante RT-PCR en tiempo real. En algunos estudios, las velocidades de reversión de 5'NCR-57 de las 24 semillas P7 fueron medidas por TaqMAMA. Dependiendo de la concentración del ARN viral de entrada para cada virus en el ensayo, el límite de sensibilidad del TaqMAMA varió entre 0,01% y 0,07% de reversión, lo cual es más sensible que el límite de sensibilidad de reversión de 10-30% detectable por un análisis de secuencia del genoma consenso. Los datos resultantes ilustran que 15 de los 24 virus P7 tenían una reversión mínima o no detectable (<0,07%), un virus (DENVax-3-D) tuvo casi 100% de reversión y 8 virus (1 DENVax-1, 1 DenVax-2, 2 DENVax-3 y 4 DENVax-4) tuvieron una reversión parcial que osciló de 0,08% a 12,85% (Tabla 2). Para 16 de los 24 virus P7 con bajos niveles de reversión de 5'NCR57 medidos por TaqMAMA, se llevó a cabo una secuenciación completa del genoma. Todos los virus secuenciados mantuvieron los otros dos determinantes de atenuación DENVax (NS1-53, NS3-250) y todos adquirieron mutaciones adicionales que no estaban presentes en los clones de ADNC recombinante originales, modificados mediante ingeniería genética (Tabla 2). En una composición de vacuna diana ilustrativa, se seleccionaron DENVax-1-A, DENVax-2-F, DENVax-3-F y DENVax-4-F como semilla pre-maestra diana para cada serotipo debido a que sus genotipos y fenotipos de placa se asemejan de forma más cercana a los recombinantes para vacuna diseñados originalmente. DENVax-1-A, DENVax-2-F y DENVax-4-F tuvieron dos mutaciones no sinónimas y DENVax-3-F tuvo una. La evidencia sugiere que estas mutaciones adicionales observadas en estas 4 semillas pre-maestras no causan problemas de seguridad o alteración de immunogenicidad para los virus. Estas semillas pre-maestras se amplificaron adicionalmente para generar la MVS (semilla maestra designada como P7, Tabla 1).

Los métodos ilustrativos proporcionados en el presente documento utilizaron ARN viral transcrit *in vitro* purificado a partir de plásmido de ADNC clonado como fuente pura para transfectar las células Vero certificadas para generar virus de vacuna. Las purificaciones en serie de las placas y los análisis de secuencia de genoma completo se incorporaron a los procedimientos de fabricación para asegurar que las semillas de vacuna fabricadas tienen estabilidad genética y pureza óptimas. Se prepararon seis virus clonados como semillas pre-maestras potenciales para cada serotipo de DENVax. A través del análisis genómico, incluyendo TaqMAMA y secuenciación genómica completa, así como caracterización de los fenotipos de placas virales, las semillas pre-maestras se seleccionaron para avanzar hacia la producción de semillas de virus maestras para cada serotipo (serotipos 1-4). Las semillas pre-maestras seleccionadas tuvieron reversiones no detectables (<0,01% o <0,07%) en el locus 5'NCR-57, con 1 o 2 sustituciones de aminoácido en sus genomas, y conservaron los pequeños fenotipos de placa previamente observados.

Tabla 2. Caracterización de las semillas pre-maestras (P7)

Virus	Clon ^a	TaqMAMA ^b	Log ₁₀ ufp/mL	Placa ^c	Mutaciones identificadas en el genoma ^d
DENVax-1	A	**	6,85	P2	NS2A-116 I-L, NS2B-92 E-D, una silenciosa
	B	*	6,93	P2	nd ^e
	C	*	6,93	D	nd
	D	**	7,02	D	C-67 K-A; una silenciosa
	E	0,57%	7,28	P2	Nd
	F	**	7,18	P2	E473 T-M; una silenciosa
DENVax-2	A	0,03%	6,33	P2	NS1-341 K-N
	B	*	6,33	P2	E-305 K-T, dos silenciosas
	C	*	5,84	L	NS4A-18 T-A, cuatro silenciosas
	D	0,08%	6,20	P2	NS2B-99 I-L, una 3'NCR
	E	0,03%	6,31	P2	prM-52 K-E, NS5-412 I-V, dos silenciosas
	F	**	6,15	P2	prM-52 K-E, NS5-412 I-V
DENVax-3	A	*	6,00	P2	NS5-200 K-N, una silenciosa, una 3'NCR
	B	0,05%	6,27	P2	NS2A-33 I-T, NS2A-59 M-T
	C	0,30%	6,25	P2	nd
	D	100,00%	6,27	P2	nd
	E	0,31%	6,00	P2	nd
	F	**	6,30	P2	E-223 T-S, una silenciosa
DENVax-4	A	0,47%	5,60	P2	E323 K-R/K, NS2B-21 L-F/L, NS2B-39 T-S, uno silenciosa
	B	*	5,65	D	NS2A-126 A-V; NS4A-5 N-D; NS5-383 K-R, una silenciosa
	C	4,50%	5,90	P2	nd

	D	12,85%	5,97	D	nd
	E	0,52%	6,85	S	prM-85 E-D, NS2B-45 T-A, NS5-320 M-T, NS5-551 E-G, dos silenciosas
	F	0,02%	6,93	S	NS2A-66 D-G, NS4A-21 A-V, cuatro silenciosas

^a: Los virus clonados (mediante purificaciones de placa seriadas) seleccionados para ser posteriormente desarrollados para MVS, se muestran en negrita.
^{b*}: Velocidad de reversión <0,07% (límite de detección). ^{**}: Velocidad de reversión <0,01% (límite de detección)
^c: Fenotipos de placa: P2: similar al virus P2; L=mayor que el virus P2, D=similar en tamaño, pero aparece un poco diferente en la claridad de las placas; S= menor que P2.
Sustituciones difieren de los clones ADNc DENVAx modificados mediante ingeniería genética. Las mutaciones de aminoácidos se enumeran con la posición del resto de la proteína del virus y los cambios (wt-mutación). Se enumera el número total de mutaciones silenciosas en genes estructurales y no estructurales de cada semilla. También se anotan las mutaciones en la región no codificante (NCR).
nd = no realizado. Estos clones tuvieron velocidades de reversión 5'NCR-57 mayores (por TaqMAMA) que otros clones, de tal forma que se excluyen para posterior análisis de secuencia.

Ejemplo 2

En algunos métodos ilustrativos, se describen las composiciones de semillas de virus maestras, semillas de virus de trabajo y semillas de virus en masa, así como su caracterización genética y fenotípica. Estas composiciones se proporcionan para la fabricación de materiales clínicos y finalmente de suministros de vacunas comerciales. Las purificaciones seriadas de placas y los análisis de secuencia de genoma completos se incorporan al procedimiento de fabricación para garantizar composiciones de semillas de vacuna con seguridad y estabilidad genética óptimas para la fabricación de materiales de prueba clínicos.

Controles de calidad de producción y fabricación para MVS, WVS y BVS.

En algunos estudios, se produjeron MVS de 4 DENVAx mediante la amplificación de la semilla P7 pre-maestra en células Vero certificadas. En otros estudios se utilizaron MVS para producir una gran cantidad de WVS en factorías celulares. Adicionalmente, se amplificaron provisiones de partida de BVS de DENVAx a partir de WVS y se formularon en mezclas de productos de fármacos tetravalentes que se iban a utilizar para pruebas clínicas en seres humanos. Los controles de calidad para la liberación de productos se realizaron en algunos métodos ilustrativos, incluyendo, pero sin limitarse a, pruebas de identidad, título infeccioso, esterilidad, micoplasmas y agentes adventicios *in vitro* e *in vivo* de todos los MVS, WVS y BVS. Todas las semillas pasaron la prueba de identidad de virus empleando los ensayos RT-PCR específicos de serotipo, que mostraron una amplificación positiva, correspondiente a su serotipo y negativa para serotipos heterólogos (datos no mostrados). No se detectaron micoplasmas o agentes adventicios en las provisiones de partida de MVS, WVS o BVS.

Análisis genético de MVS, WVS y BVS

En ciertos métodos ilustrativos, después de la generación de MVS a partir de pre-MVS (P7) seleccionadas se produjeron las cepas seleccionadas anteriormente y su respectivo ARN viral se secuenció de nuevo. La secuenciación del genoma completo reveló que la MVS para DENVAx-1 era idéntica a su semilla pre-maestra, mientras que la WVS y la BVS subsiguiente adquirieron 2 sustituciones adicionales en E-483 y NS4B-108 (véanse Tablas 2 y 3). La sustitución Ala en E-483 representó parte del genotipo en MVS, pero se volvió el genotipo dominante en BVS. DENVAx-2 y DENVAx-3 fueron idénticos a sus semillas pre-maestras respectivas (Tabla 2 y 3). La MVS de DENVAx-2 fue idéntica a su semilla pre-maestra, y el WVS y BVS tuvieron 2 mutaciones adicionales en NS4A-36 y NS4B-111. Ambas mutaciones fueron parciales en WVS y mayores en el genotipo de BVS. El MVS de DENVAx-3 fue nuevamente idéntico a la semilla pre-maestra, pero WVS y BVS contenían una sustitución adicional en NS4A-23. La MVS de DENVAx-4 adquirió una mutación adicional de aminoácido en el locus NS2A-99 (de Lys al genotipo mixto Lys/Arg) durante la producción de la MVS (Tabla 3). Su WVS y BVS conservaron el genotipo mixto NS2A-99 Lys/Arg y la BVS tuvo un genotipo mixto extra NS4B-238 Ser/Phe. Los resultados de la secuencia consenso también confirmaron que MVS, WVS, así como BV conservaron los tres determinantes genéticos de atenuación en los loci 5'NCR-57, NS1-53 y NS3-250. El análisis del locus atenuante menos estable por TaqMAMA demostró que la velocidad de reversión de 5'NCR-57 varía entre <0,7% y 0,13% para las MVS, ≤0,07% para las WVS y entre <0,07% y 0,21% para las BVS. Una reversión de 3% en el locus 5'NCR/57 se consideró la velocidad máxima permisible para aceptar un lote de vacuna (Tabla 3).

Tabla 3. Sustituciones de nucleótidos y aminoácidos en semillas DENVAx

DENVAx	Nucleótidos	Aminoácidos	Pre-maestra	MVS ^a	WVS ^a	BVS ^a
--------	-------------	-------------	-------------	------------------	------------------	------------------

ES 2 965 652 T3

DENVax-1	2384 G-C	E-483 Gly-Ala	-	-	Gly/Ala	Ala
	3823 A-C	NS2A-116 Ile-Leu	Leu	Leu	Leu	Leu
	4407 A-T	NS2B-92 Glu-Asp	Asp	Asp	Asp	Asp
	7148 C-T	NS4B-108 Thr-Ile	-	-	Ile	Ile
	7311 A-G	Silenciosa	G	G	G	G
	TaqMAMA 5'NCR-57 % de reversión ^b	--	-	-	-	-
DENVax-2	592 A-G	prM-52 Lys-Glu	Glu	Glu	Glu	Glu
	6481 G-C	NS4A-36 Ala-Pro	-	-	Ala/Pro	Pro
	7156 C-T	NS4B-111 Leu-Phe	-	-	Leu/Phe	Phe
	8803 A-G	NS5-412 Ile-Val	Val	Val	Val	Val
	TaqMAMA 5'NCR-57 % de reversión ^b	--	-	0,07%	0,21%	
DENVax-3	1603 A-T	E-223 Thr-Ser	Ser	Ser	Ser	Ser
	6436 G-A	NS4A-23 Asp-Asn	-	-	Asn	Asn
	7620 A-G	Silenciosa	G	G	G	G
	TaqMAMA 5'NCR-57 % de reversión ^b	--	-	-	-	-
DENVax-4	225 A-T	Silenciosa	T	T	T	T
	3674 A-G	NS2A-66 Asp-Gly	Gly	Gly	Gly	Gly
	3773 A-A/G	NS2A-99 Lys-Lys/Arg	-	Lys/Arg	Lys/Arg	Lys/Arg
	5391 C-T	Silenciosa	T	T	T	T
	6437 C-T	NS4A-21 Ala-Val	Val	Val	Val	Val
	7026 T-C	Silenciosa	T/C	T/C	T/C	T/C
	7538 C-C/T	NS4B-238 Ser-Ser/Phe	-	-	Ser/Phe	Ser/Phe
	9750 A-C	Silenciosa	C	C	C	C
	TaqMAMA 5'NCR-57 reversión % ^b	-	0,13%	-	-	-

^a Negrita: Cambios iniciados en las provisiones de partida de MVS

^b "--" Indica una velocidad de reversión <0,01% (límite de detección), "-" Indica una velocidad de reversión <0,07% (límite de detección)

El análisis de la secuencia del genoma completo reveló una mutación adicional de aminoácido desarrollada en MVS de DENVax-4, mientras que los otros tres lotes de MVS de DENVax mantuvieron la secuencia de genoma consenso de sus semillas pre-maestras. En general, de la obtención de las semillas P1 a las semillas pre-

maestra (P7), sólo se produjeron 1 o 2 mutaciones no-sinónimas en una semilla dada. De las semillas P1 a MVS (P8), se identificaron de 2 a 7 sustituciones de nucleótidos en una semilla DENVax dada y solo 2 a 3 de estas sustituciones dieron como resultado cambios en aminoácidos. Por tanto, solo se produjeron cambios pequeños. Los virus de ARN son propensos a errores durante su replicación genómica, de tal forma no se esperaban sustituciones genéticas en los genomas de flavivirus durante los pases de células. Ninguna de las mutaciones silenciosas de MVS fue dentro de 5' o 3'NCR que podían afectar a la replicación del virus. Solamente el cambio en el prM-52 Lys-Glu de DENVax-2 y la sustitución en NS2A-66 Asp-Gly de DENVax-4 no fueron cambios conservativos. La mutación NS2A-66 de DENVax-4 está en la parte de la cadena principal no estructural de DENV-2 PDK-53. Aunque el locus NS2A-66 son usualmente Asp en las diferentes cepas de DENV-2, normalmente será Gly para DENV-4. Es posible que el cambio de Asp a Gly en el DENVax-4 sea relevante para el ajuste de DENVax-4 en células Vero. La mutación de DENVax-2 prM-52 reside en la porción C-terminal de prM que es escindida de las partículas de virus maduros. En algunos métodos ilustrativos, se realizó una caracterización fenotípica para confirmar que ninguna de las mutaciones en las semillas MVS alteraba significativamente los fenotipos de atenuación de la vacuna.

Los virus DENVax demostraron una alta estabilidad genética durante el procedimiento de fabricación. Los tres loci de atenuación definidos para DENV-2 PDK-53 localizados en 5'NCR, NS1-53 y NS3-250 permanecieron estables en la secuencia del genoma consenso tras un pase en serie de DENVax a partir de cepas pre-Maestras a preparaciones de vacunas en masa. El TaqMAMA altamente sensible del locus 5'NCR-57 demostró una reversión mínima o no detectable en MVS, WVS (P9/Trabajo) y BVS (Semillas de Virus en Masa para vacunas) de los serotipos del virus del dengue. Las velocidades de reversión de 5'NCR-57 de las preparaciones de BVS de DENVax (equivalente P10) fueron significativamente menores que las velocidades de reversión de 5'NCR-57 que evolucionaron en candidatos a vacunas de grado de investigación después de 10 pases seriados en células Vero (4-74% de reversión). La estrategia para la fabricación a gran escala de las semillas DENVax proporcionada en el presente documento dio como resultado una semilla de vacuna genéticamente estable que conservó los marcadores de atenuación en los virus candidatos a vacunas.

Fenotipo de placa de MVS de DENVax

En un método ilustrativo, los fenotipos de placa de MVS de DENVax se compararon con los virus del Dengue

de tipo salvaje y sus virus químicos de grado de investigación homólogos en células Vero (**Fig. 2**). Todos los MVS de DENVax-1, -2, -3 produjeron placas que fueron significativamente menores que sus homólogos de tipo salvaje y muy similares (dentro de 0,4 mm de diferencia) a sus virus homólogos de grado de investigación en células Vero. MVS de DENVax-4 también fue significativamente menor que DENV-4 de tipo salvaje, pero fue ligeramente mayor (0,9 mm de diferencia) que la quimera original D2/4-V obtenida en el laboratorio.

La Fig. 2 representa un histograma que ilustra los tamaños de placa de MVS de DENVax en contraste con los virus de tipo salvaje de control y los virus candidatos a vacunas de grado de investigación. Los diámetros de placa medios (mm) \pm DT (barras de error) de las placas del virus en las células Vero bajo recubrimiento de agarosa se midieron en el día 9 pi. Los virus DEN de tipo salvaje representados por barras de color negro, y los virus candidatos a vacunas de grado de investigación publicados previamente, representados por barras de color blanco, fueron incluidos para control y comparación con las semillas de vacuna DENVax maestras representadas por las barras de color gris.

15 *Sensibilidad a la temperatura de MVS de DENVax*

En otro ejemplo ilustrativo, se sometió a prueba la sensibilidad a la temperatura en células Vero del MVS de DENVax y se comparó con sus homólogos de tipo salvaje y el virus de vacuna químico de grado de investigación original. DENV-3 16562 de tipo salvaje (wt) no fue sensible a la temperatura. El virus del Dengue wt de serotipo 1 y el virus del dengue de serotipo-4 fueron moderadamente sensibles a la temperatura a 39°C (los títulos fueron aproximadamente 1,0 log₁₀ ufp/ml menores a 39°C que a 37°C, Fig. 3). El virus del dengue wt de serotipo-2 16681 fue el más sensible a la temperatura de los virus del Dengue wt sometidos a prueba y dio como resultado una caída de título de 100 veces a 39°C. DENVax-1, -2, -3 fueron tan sensibles a la temperatura como los virus de vacuna químicos grado de investigación homólogos originales (Fig. 2). Los títulos a 39°C cayeron entre 2,0 y 3,0 log₁₀ ufp/mL para estas cepas de DENVax. DENVax-4 también fue sensible a la temperatura mostrando una reducción de 5 veces en el título. Sin embargo, D2/4-V de grado de investigación original mostró aproximadamente una reducción de 10 veces en el título. El MVS de DENVax-4 final, estabilizado, contenía F127 (y otros agentes que se sabe que estabilizan estas formulaciones (FTA)), que se demostró que potenciaba la estabilidad térmica del virus del Dengue. La presencia de F127 en MVS de DENVax-4 probablemente contribuyó a la sensibilidad a la temperatura menos pronunciada del virus en el ensayo de cultivo con Vero. En un experimento separado, se evaluó adicionalmente la sensibilidad a la temperatura de una cepa DENVax-4 obtenida de MSV en la ausencia de F127. Para eliminar F127 de la cepa, el ARN viral se aisló de una preparación en masa de DENVax-4 y se transfeció a células Vero. Este virus DENVax-4 parece ser tan sensible a la temperatura como la cepa de investigación D2/4V (el título se redujo a 1,5 log₁₀ ufp/mL) en el día 3pi en ausencia de F127 (Fig. 3).

La Fig. 3 ilustra un histograma ilustrativo que muestra las sensibilidades a la temperatura de MVS de DENVax. Los virus del dengue de tipo salvaje y los virus candidatos a vacuna de grado de investigación publicados previamente se incluyeron como comparación. MVS de DENVax-4 contiene F-127 adicional que puede enmascarar los resultados de sensibilidad a la temperatura del virus en este ensayo. Se incluyó también un experimento separado analizando un sustituto de DENVax-4 en ausencia de F127. Títulos medios \pm DT (barras de error) de los virus replicados en células Vero a 37°C o 39°C.

45 *Replicación de MVS de DENVax en células C6/36 de mosquito*

En algunos métodos ilustrativos, las MVS de DENVax fueron cultivados en células C6/36 para verificar la retención del fenotipo de atenuación *in vitro*, con el conocimiento de que los virus de vacuna químicos de grado de investigación conservaban el fenotipo de atenuación de la cadena principal del virus DENV-2 PDK53 en estas células de mosquito. Comparados con los virus del dengue wt, las MVS de DENVax-1, DENVax-2, DENVax-4 mostraron una reducción significativa de crecimiento (al menos una reducción de 3 log₁₀ ufp/mL) en células C6/36 el día 6pi (Fig. 4). Las MSV de DENVax-3 también exhibieron una reducción del crecimiento en comparación con DENV-3 16562, pero la reducción no fue tan marcada (reducción de 1-2 log₁₀ ufp/mL). Sin embargo, los títulos en C6/36 de los lotes de las semillas DENVax-3 fueron similares (dentro de una diferencia de 1 log₁₀ ufp/mL) al título en C6/36 del virus de vacuna D2/3-V químico de grado de investigación original.

55 La Fig. 4. Ilustra un histograma ilustrativo que traza el crecimiento restringido de MVS de DENVax (barras de color gris) en células C6/36 en comparación con los virus del Dengue wt (barras de color negro) y los virus de vacuna de grado de investigación (barras de color blanco). Títulos medios \pm DT (barras de error) de los virus replicados en células C6/36 6 días pi.

60 *Velocidades de infección, diseminación y transmisión de virus en mosquitos completos*

En algunos métodos ilustrativos, la tasa de infección y diseminación de DENVax se comparó con sus virus del Dengue wt progenitores. En algunos experimentos ilustrativos, se llevaron a cabo experimentos de infección oral en mosquitos *Ae. Aegypti*. La harina de sangre infectada fue titulada de nuevo para medir los títulos del virus y solo se incluyeron como comparación en la Tabla 4 los experimentos con títulos de virus similares en

- la harina de sangre (menos de 1 \log_{10} ufp/mL de diferencia) entre los virus del Dengue progenitores y DENVax para cada serotipo. DENVax-1, DENVax-2 y D2 PDK-53-VV45R de grado de investigación no infectaron los mosquitos a través de la alimentación oral, lo que es significativamente diferente ($p<0,0001$) de sus virus progenitores, DENV-1 16007 (44% de infección) y DENV-2 16681 (43,3% de infección). Ya que no se infectó ninguno mosquito con DENVax-1 y -2, hubo poca o ninguna preocupación por la diseminación de estos dos virus de vacuna. Mientras que DENVax-4 si infectó a algunos de los mosquitos mediante alimentación oral (2 de 55) la tasa de infección fue significativamente menor ($p<0,05$) que la de su virus wt progenitor, DENV-4 1036 (8 de 50). DENVax-3 no infectó ninguno mosquito en dos experimentos separados con títulos de virus de harina de sangre de $5,2\pm0,02 \log_{10}$ ufp/mL (Tabla 4) y en un experimento separado con título viral de harina de sangre $6,0 \log_{10}$ ufp/mL solo 1 de cada 30 mosquitos se infectó (datos no mostrados). Sin embargo, el virus del Dengue-3 16562 wt también tuvo una tasa de infección muy baja (8%) a $5,2 \log_{10}$ ufp/mL y la velocidad no aumentó en un experimento separado con un título viral mayor de harina de sangre a $6,2 \log_{10}$ ufp/mL (3%, 1 positivo de 30 mosquitos, datos no mostrados). Aunque el virus del dengue-3 y el virus del dengue-4 de tipo salvaje (wt) tuvieron tasas de infección significativamente menores que el virus del dengue-1 y virus del dengue-2 wt, los títulos medios de los virus en los mosquitos infectados fueron similares ($3,1$ a $3,9 \log_{10}$ ufp/mosquito).
- En contraste, los títulos de DENVax-4 de dos mosquitos infectados fueron ambos mínimos ($0,7 \log_{10}$ ufp/mosquito), lo que fue 1.000 veces menor que el título de los mosquitos infectados con el serotipo 4 de virus del dengue 1036 wt ($3,9 \pm 1,5$ ufp/mosquito).
- Para aquellos mosquitos infectados, la diseminación fuera del intestino medio pudo verificarse determinando si el virus estaba presente en las patas. Los cuatro DENV progenitores dieron como resultado velocidades de diseminación entre 36,3% y 62,5% y sus títulos virales medios (en \log_{10} ufp) de las patas estuvieron entre $0,9\pm0,3$ y $2,2\pm0,7$ (excluyendo a las muestras negativas). Ninguno de los mosquitos infectados con DENVax-4 dio como resultado una diseminación del virus a las patas (Tabla 4). Mientras que el virus diseminado fue detectable en las patas, ninguno de los cuatro virus del Dengue wt fue detectable en la saliva de mosquitos infectados oralmente, sugiriendo que las condiciones de alimentación oral pueden no ser lo suficientemente sensibles para medir la velocidad de transmisión de estos DENV. Por lo tanto, en otros métodos ilustrativos, se realizaron posteriormente infecciones artificiales de mosquitos altamente estrictas mediante inoculación directa IT (Tabla 4). Con excepción de DENVax-4 todos los virus (wt y DENVax) alcanzaron 100% de infección de los Ae. *Aegypti* que recibieron la inoculación IT. El inoculo de DENVax-4 tuvo un título viral ligeramente menor que los otros tres inóculos virales, pero aun así infectó satisfactoriamente 70% de los mosquitos que recibieron la inoculación. A pesar de las altas velocidades de infección corporales alcanzadas por inoculación IT, los cuatro virus DENVax exhibieron velocidades de transmisión significativamente inferiores ($p<0,005$) o no detectables (0-10%) comparadas con los virus del Dengue wt (43-87%, Tabla 4). Los virus DENVax demostraron poca o ninguna infección y diseminación después de alimentación oral y los resultados IT altamente estrictos confirmaron la mínima capacidad de transmisión de estos virus DENVax en Ae. *Aegypti*.

Tabla 4: Velocidades de infección, propagación y transmisión de virus en mosquitos completos

Virus	Alimentación Oral					Inoculación IT					p^d
	Harina de Sangre ^a	Infección ^b	Título en el organismo ^c	Disemina-ción ^e	Inóculo	Infección ^b	Título en el organismo ^c	Saliva ^f			
	Media±DT	%(P/N)	Media±DT	p ^d	Ufp/dosis	%(P/N)	Media±DT	%(P/N)			
DENV-1 16007	6,6	44,0% (11/25)	3,6±1,5		36,3% (4/11)	53,9	100% (30/30)	4,7±0,48	43% (13/30)		
DENVax-1	6,9	0% (0/30)	NA	<0,0001	NA	67,8	100% (30/30)	3,4±0,39	10% (3/30)	<0,005	
DENV-2 16681	6,6	43,3% (13/30)	3,1±1,5		38,5% (5/13)	67,8	100% (30/30)	5,2±0,34	87% (26/30)		
D2 PDK 53-W45 R	6,4	0% (0/30)	NA	<0,0001	NA	56,4	100% (30/30)	4,0±0,20	0% (0/30)	<0,0001	
DENVax-2	6,4	0% (0/30)	NA	<0,0001	NA	52,7	100% (30/30)	3,5±0,27	7% (2/30)	<0,0001	
DENV-3 16562	5,2	8% (2/25)	3,8±0,2		50% (1/23)	34,0	100% (30/30)	4,2±0,50	67% (20/30)		

DENVax-3	5,2±0,02	0% (0/50)	NA	0,108	NA	37,3	100% (30/30)	3,3±0,36	3% (1/30)	<0,0001
DENV-4 1036	5,8±0,5	16% (8/50)	3,9±1,5		62,5% (5/8)	69,4	100% (30/30)	5,2±0,45	70% (21/30)	
DENVax-4	5,4±0,4	3,6% (2/55)	0,7±0,0	0,033	0% (0/2)	11,8	70% (21/30)	1,1±0,46	0% (0/21)	<0,0001

^a Títulos de virus o Media ± desviación típica si es de más de un experimento en harina de sangre (\log_{10} ufp/mL) mediante retrotitulación.

^b Tasa de virus detectados en organismos de mosquito. P/N = mosquitos positivos/totales

^c Títulos medios de virus ± desviación típica (\log_{10} ufp/mosquito) en el organismo de mosquito, solo se incluyen en el cálculo las muestras positivas.

^d Análisis estadístico de las diferencias entre DENV wt y DENVax mediante probabilidad Exacta de Fisher.

^e Tasa de virus detectados en patas de los mosquitos infectados de forma positiva

^f Tasa de virus detectados en saliva de los mosquitos infectados de forma positiva. Empleada para medir la eficacia de transmisión.

La competencia del vector es un componente de seguridad importante para los virus de vacunas de flavivirus vivos, atenuados. Previamente, los virus de grado de investigación DENV-2 PDK-53-VV45R y derivados wt se probaron en *Ae aegypti* y se encontró que la mutación atenuante NS1-53-Asp era el determinante dominante

5 para dañar la replicación en mosquitos. Los otros dos loci de atenuación principales de la vacuna DENV-2 PDK-53, nucleótidos 5'NCR-57-T y NS3-250-Val también mostraron cierto efecto inhibidor sobre la replicación en mosquitos, proporcionando de ese modo restricciones redundantes adicionales para competencia del vector en mosquito. Algunos métodos ilustrativos descritos en el presente documento, fueron utilizados para probar la infección oral e IT en mosquito y la replicación de las cuatro cepas DENVax. DENVax-1, -2 y -3 no afectaron ninguno de los mosquitos *Ae. Aegypti* a través de una infección oral (Tabla 4). DENVax-4 infectó solamente 10 3,6% de los mosquitos expuestos oralmente, un nivel significantemente menor que el de DENV-4 wt con un título medio replicativo en los organismos de los mosquitos menor que los mosquitos infectados con DENV-4. De forma sorprendente DENVax-4 se detectó en las patas de los mosquitos infectados, sugiriendo que DENVax-4 no fue capaz de diseminarse desde el intestino medio del mosquito después de la infección oral.

15 Las tasas de infección de DENVax-1, -2 y -4 fueron significantemente menores que las de sus contrapartes wt, pero la diferencia no fue significativa entre DENVax-3 y su DENV-3 16562 wt debido a las muy bajas tasas de infección para ambos virus. En comparación con otras cepas wt del DENV, evaluadas en *Ae. Aegypti* recolectados de la misma Provincia Mae Sot, en Tailandia, las cepas progenitoras de virus del Dengue empleadas para modificar mediante ingeniería genética DENVax parecían tener menores tasas de infección y 20 diseminación mediante infección oral. DENV-1 PU0359, DENV-2 PU0218, DENV-3 PaH881/88 y DENV-4 1288 wt empleados para modificar mediante ingeniería genética las vacuna ChimeriVax-DEN basadas en la vacuna 17D contra la Fiebre Amarilla (YF) tuvieron tasas de infección en el rango de 47-77%. En contraste la vacuna 17D contra YF no pudo infectar *Ae. Aegypti*, aunque las cepas ChimeriVax contenían prM-E de estos DENV 25 wt altamente infecciosos, ChimeriVax conservó el fenotipo de atenuación en el mosquito de su cadena principal replicativa 17D contra YF. Los resultados proporcionados en el presente documento también indican que la atenuación en el mosquito de la cadena principal DENV-2 PDK-53 se mantuvo en la cepa DENVax. Además, empleando las cepas del virus del Dengue wt con menor inefectividad en mosquito en las construcciones 30 incluidas en las composiciones descritas en el presente documento, proporciona un rasgo adicional de seguridad.

Los resultados de la infección oral ilustran que DENVax tuvo una inefectividad y una capacidad de diseminación 35 mínimas en los mosquitos. Además, los experimentos de infección IT más sensibles y estrictos se realizaron para analizar adicionalmente el potencial de DENVax para ser transmitido por *Ae. Aegypti*. Los resultados IT demostraron que los cuatro virus DENVax tenían un potencial de transmisión en el mosquito no detectable o mínimo, comparados con sus contrapartes wt. La transmisión de DENVax podría ocurrir solo de forma teórica si (1) las alimentaciones de vectores en un vacunado con suficiente título de viremia infectaran el intestino medio del mosquito, (2) el virus fuera capaz de replicarse en el epitelio del intestino medio y fuera capaz de diseminarse subsecuentemente fuera del intestino medio y (3) el virus diseminado se pudiera replicar en la glándula salival y expectorara suficiente virus en la saliva para su transmisión. El umbral para la viremia humana requerido para infectar los mosquitos no se ha establecido adecuadamente, pero la viremia en seres humanos 40 puede ser 10^6 - 10^8 de la dosis₅₀ infecciosa MID₅₀/mL para los mosquitos después de una infección por DENV wt natural. Esta MID₅₀ se basó en la inoculación directa IT de mosquitos con plasma humano diluido. El análisis de DENVax en primates no humanos indicó que los títulos de viremia después de la inmunización con DENVax fueron muy bajos (menos de 2,4 \log_{10} ufp/mL) y duraron 2-7 días. Dados los bajos niveles de viremia y la baja 45 infección, diseminación y capacidad de transmisión de DENVax en mosquitos, es poco probable que estos virus de vacuna puedan transmitirse por mosquitos en la naturaleza o que causen viremia.

Por lo tanto, se propone que se podría utilizar cualquiera de los pases de cualquiera de los serotipos (P1-P10)

en una composición para generar una vacuna segura y eficaz contra uno, dos, tres o los cuatro serotipos del virus del dengue.

Neurovirulencia en ratones lactantes

- 5 Los virus de vacuna de grado de investigación originales fueron altamente atenuados en cuanto a la neurovirulencia en ratones ICR recién nacidos mantenidos en las propias instalaciones en DVBD/CDC. Todos estos ratones sobrevivieron a la sensibilización dosis ic (intracerebral) con 10^4 ufp de cada virus de vacuna. El virus del dengue serotipo-2 16681 wt, por otra parte, dio como resultado una mortalidad de 62,5-100% en estos 10 ratones CDC-ICR en varios experimentos. En algunos experimentos los ratones ICR comerciales obtenidos de los laboratorios Taconic (Taconic-ICR) se emplearon para estudiar la neurovirulencia en ratones recién nacidos. Se observó que los ratones Taconic-ICR recién nacidos eran significativamente más susceptibles a la infección por virus del dengue serotipo-2 que los ratones CDC-ICR previos. La Fig. 5A resume la neurovirulencia del serotipo-2 del virus del dengue 16681 wt en una colonia de CDC-ICR y ratones recién 15 nacidos Taconic-ICR sensibilizados ic con 10^4 ufp del virus. Los ratones Taconic-ICR (100% de mortalidad en 32 ratones, tiempo de supervivencia promedio de $8,3 \pm 0,5$ días) fueron más susceptibles al serotipo-2 del virus del Dengue 16681 ic que los ratones CDC-ICR (91% de letalidad en 72 ratones, tiempo de supervivencia promedio de $14,6 \pm 2,3$ días).
- 20 En otros métodos ilustrativos, con el fin de evaluar la neurovirulencia de la MVS de DENVAx, los ratones Taconic-ICR fueron sensibilizados inicialmente ic (intracerebralmente) con una dosis de aproximadamente 10^4 ufp de serotipo-2 de virus del Dengue 16681 wt, virus D2 PDK-53 VV45R, D2/3-V o DENVAx 1-4 en uno ($n=16$), o dos ($n=31-32$) experimentos (Fig. 5B). A esta dosis, los virus de grado de investigación D2/3-V, así como 25 MVS de DENVAx-1 y DENVAx-3 exhibieron fenotipos de neurovirulencia completamente atenuados (sin enfermedad ni mortalidad). Como se esperaba, se encontró que el serotipo-2 de virus del Dengue wt era "letal", con un tiempo supervivencia promedio ("AST en sus siglas en inglés") de ratones de $8,3 \pm 0,8$ días. En estos ratones Taconic-ICR sensibles al serotipo-2 del virus del Dengue, el virus de grado de investigación D2 PDK-53-VV45R dio como resultado 81,3% de mortalidad. La MVS de DENVAx-2 y la MVS de DENVAx-4 fueron uniformemente letales en los ratones Taconic-ICR, mostrando valores de AST de $9,8 \pm 1,7$, $10,2 \pm 1,4$ y $11,3 \pm 0,4$ 30 días, respectivamente.

En algunos métodos ilustrativos, la neurovirulencia del serotipo-2 del virus del Dengue 16681 wt se comparó con la de D2 PDK-53 VV45R, MVS DENVAx-2 y MVS DENVAx-4, así como el virus de grado de investigación D2/4-V, a una dosis 10 veces menor (10^3 ufp, Fig. 5C). El serotipo-2 del virus del Dengue wt mantuvo un 35 fenotipo neurovirulento uniformemente letal, con AST de $9,0 \pm 1,4$ días a esta dosis de sensibilización más baja. Los otros 4 virus exhibieron fenotipos de neurovirulencia intermedios, y el grado de neurovirulencia fue específico del serotipo. El virus D2 PDK-53-VV45R y su MVS de DENVAx-2 afín mostraron atenuación significativa (supervivencia de 32,3% con AST de $13,1 \pm 3,8$ días y supervivencia de 31,2% con AST de $10,5 \pm 3,4$ días, respectivamente). Tanto MVS de DENVAx-4 como el virus de grado de investigación D2/4V fueron 40 altamente atenuados en cuanto a su neurovirulencia (supervivencia de 81,3% con AST de $18,8 \pm 5,8$ días y supervivencia de 100%, respectivamente). Los resultados sugieren que la MVS del DENVAx-1 y -3 exhiben una atenuación completa de la neurovirulencia, mientras que los lotes de MVS de DENVAx-2 y -4 conservaron los fenotipos de atenuación que asemejaban cercanamente a sus candidatos a vacuna de virus de grado de 45 investigación homólogos.

Las Fig. 5A-5C representan gráficas ilustrativas que muestran la neurovirulencia en ratones recién nacidos sometidos a prueba con diversas composiciones, incluyendo el serotipo-2 del virus del Dengue wt y virus de Dengue atenuados diferentes. Los resultados agrupados de numerosos experimentos resumen la neurovirulencia del serotipo-2 del virus del Dengue 16681 wt en ratones CDC-ICR ($n=72$) y ratones recién 50 nacidos Taconic-ICR ($n=32$) sensibilizados ic con 10^4 ufp del virus (A). La neurovirulencia de MVS de DENVAx se sometió a prueba en ratones Taconic-ICR con una dosis de 10^4 ufp (B) o 10^3 ufp (C). Se indica el número de animales sometidos a prueba por grupo en un experimento ($n=16$) o dos experimentos agrupados ($n=31$ o 32).

55 *Fenotipo de placa de WVS, y BVS*

Se realizaron ciertos estudios para comparar los fenotipos de placa de WVS y BVS con MVS, virus del Dengue wt y sus quimeras de grado de investigación obtenidas en laboratorio homólogas, en células Vero (Fig. 6). Los tamaños medios de placa fueron calculados a partir de 10 placas para cada virus de vacuna, pero a partir de 60 un número reducido de DENV-1, -3, -4 wt. Todos los virus MVS de DENVAx-1, -2 y -3 produjeron placas que fueron significativamente menores que sus homólogos wt y muy similares (con diferencias de 0,4 mm) a sus virus de grado de investigación homólogos en células Vero. La MVS de DENVAx-4 también fue significativamente menor que DENV-4 wt, pero ligeramente (0,9 mm) mayor que la quimera D2/4-V obtenida a nivel de laboratorio original. Con la excepción de DENVAx-2, todas las WVS y BVS de DENVAx-1, -3, -4 65 conservaron tamaños de placa significativamente menores que aquellos producidos a partir de sus homólogos wt. Las WVS y BVS de DENVAx-2 produjeron placas que eran similares a las placas del virus DENV-2 wt en

células Vero, pero cuando se probaron en células LLC-MK₂ todas las semillas de DENVax-2 elaboradas, produjeron placas que eran un tanto menores que las de DENV-2 wt ($1,4 \pm 0,4$) y similares a D2 PDK-53-VV45R obtenido en el laboratorio ($1,0 \pm 0,3$) (Fig. 6).

- 5 La evaluación de los marcadores de fenotipo de atenuación viral, incluyendo fenotipo de placa pequeña, sensibilidad a la temperatura, reducción de la replicación en células de mosquito, reducción de la infección/diseminación/transmisión por mosquitos y reducción de la neurovirulencia en ratones ICR recién nacidos, se realizó en composiciones para provisiones de partida de MVS. Los resultados indicaron que todos los DENVax conservaron los fenotipos de atenuación esperados, similares a los virus de vacuna de grado de 10 investigación originales. Dado que las mutaciones responsables de la atenuación se conservan en MVS, WVS y BV, se puede esperar que los fenotipos atenuados se conserven en el material fabricado para pruebas clínicas humanas.

15 La Fig. 6 representa un histograma ilustrativo que muestra el tamaño de placa de MVS, WVS y BVS de DENVax. Los diámetros medios de placa \pm DT (barras de error) de las placas de virus en células Vero o LLC-MK₂ bajo capa de agarosa se midieron el día 9 pi. Los DENV wt y los virus candidatos a vacunas de grado de investigación previamente publicados, se incluyeron como control y comparación.

Replicación del virus en células C6/36 de mosquito

- 20 Los estudios previos demostraron que los virus químicos para vacuna basados en PDK-53 de grado de investigación, conservaban el fenotipo de atenuación de la cadena principal del virus DENV-2 PDK53 en células C6/36. En algunos métodos ilustrativos, las MVS, WVS y BVS de DENVax se cultivaron en células C6/36 para verificar su conservación de este marcador de atenuación in vitro después de una fabricación a gran escala.
- 25 Comparado con el virus del Dengue wt, excepto DENVax-3, las semillas fabricadas muestran una reducción marcada en el crecimiento (al menos una reducción de $3 \log_{10}$ UFP/mL) en células C6/36 el día 6 pi (Fig. 7). Las semillas de DENVax-3 también exhibieron una reducción del crecimiento en comparación con DENV-3 16562 wt, pero la reducción no fue tan marcada (una reducción de $1-2 \log_{10}$ UFP/mL). Sin embargo, los títulos de los lotes de semillas de DENVax-3 fueron similares (dentro de $1 \log_{10}$ UFP/mL de diferencia) a los del virus 30 de vacuna D2/3V químico de grado de investigación original.

La Fig. 8 representa un histograma ilustrativo del crecimiento restringido de MVS, WVS y BVS de DENVax en células C6/36. Títulos medios \pm DT (barras de error) de los virus replicados en células C6/36 a los 7 días pi. Se incluyeron virus del Dengue wt y virus candidatos a vacunas de grado de investigación, previamente publicados 35 con fines de comparación.

Neurovirulencia en ratones lactantes

- 40 Se realizaron experimentos adicionales para analizar la neurovirulencia en ratones ICR recién nacidos. Empleando una dosis intracranial de 10^4 UFP, las tasas de supervivencia para DENV-2 16681 wt y D2 PDK-53-VV45R fueron 0% y 18,8% respectivamente (Fig. 9A) en los ratones ICR, pero fueron de aproximadamente 20% para DENV-2 16681 wt y 100% para D2 PDK-53-VV45R en los ratones CDC ICR. En este estudio las MVS de DENVax-1 y DENVax-3 se atenuaron (100% de supervivencia) a los ratones con una dosis de 10^4 UFP, pero las MVS de DENVax-2 y DENVax-4 causaron 100% de mortalidad a una dosis de más de 10^4 UFP 45 (Fig. 5A). Sin embargo, cuando se sometieron a prueba a una dosis de 10^3 UFP del virus, DENVax-2 (31,3% de supervivencia) y DENVax-4 (81,3% de supervivencia) mostraron una reducción de neurovirulencia con respecto al serotipo-2 del virus del Dengue 16681 wt (0% de supervivencia) y sus tasas de supervivencia fueron similares a las de los candidatos a vacuna de grado de investigación D2-PDK53-VV45R (32,3%) y D2/4-V (100%) respectivamente (Fig. 9B). Aunque no se incluyeron DENV-1, -3 o -4 wt para fines de comparación en este estudio, el trabajo previo demostró que el DENV-1 16007 wt estaba atenuado en los ratones CDC-ICR por la vía ic, mientras que DENV-3 16562 y DENV-4 1036 wt fueron altamente virulentos (0% de supervivencia), para los ratones CDC-ICR. Es posible que estos tres DENV wt podrían exhibir virulencia similar o mayor en el ratón Taconic ICR que es más susceptible. Por lo tanto, se consideró que la inclusión de estos virus del Dengue wt para la comparación con sus MVS de DENVax homólogas no brindaría más información. Este estudio indicó 50 que las MVS de los 4 DENVax y los virus candidatos a vacuna obtenidos en laboratorio originales exhiben fenotipos de atenuación en ratón comparables, con respecto a DENV-2 16681 wt.

Las Fig. 9A-9B representan gráficos ilustrativos de datos de neurovirulencia de MVS de DENVax en ratones ICR recién nacidos. (A) Inoculaciones IC del virus a una dosis de 10^4 UFP. (B) Inoculación IC del virus a una 60 dosis de 10^3 UFP.

Todos los lotes de semillas del DENVax fueron evaluados para determinar a su identidad, esterilidad y ausencia de agentes no deseables. El análisis de secuencia de genoma completo reveló que una mutación adicional de aminoácido evolucionó en la MVS DENVax-4, mientras que las MVS de los otros 3 DENVax conservaron la secuencia de genoma consenso de sus semillas pre-maestras. En lotes WVS, DENVax-3 adquirió una mutación extra de aminoácido y los otros 3 serotipos acumularon 2 sustituciones extra de aminoácidos, con 65

respecto a sus semillas pre-maestras. Las secuencias del genoma de los 4 lotes de BVS fueron idénticas a las de sus lotes WVS. En general, de las semillas P2, a las semillas pre-maestras (P7), solo aparecieron 1 o 2 mutaciones no silenciosas en una semilla dada. Entre las semillas pre-maestras y BCS (P10), solo se observaron 1-2 sustituciones de nucleótidos, todas las cuales se produjeron en NS2A, 4A o 4B, con la excepción del cambio de un único nucleótido que dio como resultado una glicina conservada y una alanina en el resto E-483. De las semillas P2 a BVS (P10) se identificó un total de 3 a 8 sustituciones de nucleótidos para cualquier semilla DENVax dada y solo de 2 a 4 de estas sustituciones dieron como resultado cambios se aminoácido. Ninguna de las mutaciones silenciosas en BVS estuvo en la región 5'- o 3'- NCR que puede afectar a la replicación del virus. Estos resultados sugieren que los virus DENVax eran altamente estables genéticamente durante la fabricación. Los tres loci de atenuación de DENV-2 PDK-53 definidos localizados en 5'NCR, NS1-53 y NS3-250 permanecieron sin cambios en la secuencia de genoma consenso, después de un pase en serie de DENVax para generar provisiones de partida de BVS. El TaqMAMA altamente sensible del locus 5'-NCR-57 mostró una reversión mínima o no detectable en MVS, WVS y BVS de DENVax. La tasa de reversión más alta de 0,21% se identificó en la BVS DENVax-2. Las tasas de reversión de BVS equivalentes a P10 (<0,07% a 0,21%) fueron significativamente menores que las tasas de reversión que evolucionaron en otros candidatos a vacunas después de los pasos en serie en células Vero (reversión por P10 de 4-74%). Esto sugiere que esta estrategia para una fabricación a gran escala de las semillas DENVax es satisfactoria, con respecto al mantenimiento de la estabilidad genética y la conservación de los marcadores de atenuación en los virus candidatos a vacuna.

Ya que las provisiones de partida de MVS divulgadas en el presente documento se utilizarán para la futura fabricación de lotes de WVS y BVS, se implementaron paneles completos de evaluación de fenotipos de atenuación de virus, incluyendo fenotipo de placa pequeña, sensibilidad a la temperatura, reducción de la replicación en células de mosquito, reducción de la infección/disenminación/transmisión en mosquitos completos, y reducción de la neurovirulencia en ratones ICR recién nacidos para todas las MVS o sus provisiones de partida sustitutas equivalentes. Para las provisiones de partida de WVS y BVS, también se acometió el tamaño de placa y la inefectividad en células de mosquito para confirmar sus atenuaciones. Los resultados indicaron que todas las provisiones de partida de MVS de los 4 serotipos de DENVax conservaron los fenotipos de atenuación esperados, tales como placas pequeñas, reducción de la replicación en células C6/36, y reducción de la neurovirulencia en ratones, similares a los de los virus de vacuna derivados en laboratorio originales (Fig. 6, 8 y 9). Con excepción del DENVax-4, las otras tres provisiones de partida de MVS de DENVax fueron TS a 39°C como se muestra en las Fig. 3 y 7.

Para las provisiones de partida de WVS y BVS, se analizaron y confirmaron dos fenotipos de atenuación, placas pequeñas y replicación restringida en células C6/36. Puesto que había muy pocos cambios genéticos entre MVS y BVS se esperaba que pudieran conservar los fenotipos de atenuación como MVS. Además de los experimentos descritos en este informe, se han sometido a prueba la seguridad y la inmunogenicidad del DENVax elaborado en ratones Ag129 y primates no humanos.

Los métodos ilustrativos se proporcionan en el presente documento para demostrar la fabricación de provisiones de partida de MVS, WVS y BVS de DENVax bajo cGMP. Las provisiones de partida de BVS se emplearon para formular el DENVax tetravalente que se encuentra actualmente en evaluaciones en pruebas clínicas con seres humanos. En algunos métodos ilustrativos se proporcionó una estrategia de fabricación única para optimizar la estabilidad genética y la seguridad de las MVS fabricadas. Puesto que los loci de atenuación principales del DENVax han sido bien caracterizados previamente y un ensayo SNP altamente sensible y cuantificable, se desarrolló TaqMAMA para integrar la secuencia de genoma y TaqMAMA para identificar semillas pre-maestras óptimas para preparar la MVS. Las caracterizaciones genéticas y fenotípicas de MVS fueron completamente analizadas para confirmar que estos virus conservaban las atenuaciones deseables para la seguridad de la vacuna. Esta puede ser la única vacuna viral atenuada viva que puede ser analizada eficazmente para determinar los loci genéticos de atenuación principales durante la fabricación a partir de provisiones de partida pre-maestras hasta BVS. Los resultados proporcionados en el presente documento ilustran la ventaja de diseñar estratégicamente vacunas vivas atenuadas en la seguridad de las vacunas

La Fig. 10 representa una Tabla ilustrativa que compara nuevos virus vivos, atenuados con virus del dengue vivos atenuados generados previamente. Las mutaciones se indican donde difieren del virus de control (p. ej., 16681) u otros virus del dengue-2 vivos atenuados.

Materiales y métodos

Virus y células

DENV-1 16007, DENV-2 16681, DENV-3 16562 y DENV-4 1034 sirvieron como controles de DENV de tipo salvaje (wt) y fueron los genotipos progenitores de virus de los cuatro candidatos a vacunas DENVax recombinantes. Los virus de grado de investigación progenitores de DENVax, denominados D2/1-V, D2 PDK-53-VV45R, D2/3-V y D2/4-V se prepararon y caracterizaron previamente. Las células Vero (riñón del mono verde africano) se utilizaron para preparar los bancos celulares maestros y de trabajo para la producción de la

vacuna y fueron originados a partir de la línea celular CCL81 de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) que ha sido caracterizada por la Organización Mundial de la Salud (WHO) para producir vacunas (células WCB-Vero)

5 *Obtención de virus DENVax recombinantes vivos a partir de clones de ADNc*

Para volver a obtener los virus candidatos a vacunas bajo las condiciones de fabricación de cGMP, los clones de ADNc infecciosos de DENV modificados mediante ingeniería genética previamente, pD2-PDK-53-VV45R, pD2/1-V, pD2/4-V y pD2/3-V ligado *in vitro* que contenía los ADNc virales con el genoma completo se emplearon para generar transcritos de ARN virales de nueva aportación mediante transcripción *in vitro* como se ha descrito previamente. De forma resumida, los ADNc genómicos de DENV linealizados con XbaI se trataron con proteinasa K, se extrajeron con en fenol/cloroformo y se precipitaron con etanol para eliminar cualquier proteína residual y a continuación, se suspendieron en una solución tampón de Tris-EDTA sin ARNasa, antes de la transcripción. La transcripción *in vitro* se llevó a cabo empleando un kit de transcripción de alto rendimiento AmpliScribe T7 (Epicentre Technologies) siguiendo el protocolo recomendado por los fabricantes. El análogo de ARN con protección terminal de A, m7G(5')ppp(5')A (New England BioLabs) se incorporó durante la reacción de transcripción de 2h para añadir la protección terminal 5' de A al transcripto de ARN. Las muestras se trataron a continuación con ADNasa I para digerir el ADNc molde, seguido de extracción con fenol/cloroformo a bajo pH y precipitación con etanol para eliminar el ADN y las proteínas residuales. Los transcritos de ARN purificados se suspendieron en agua sin ARNasa y se distribuyeron en alícuotas de 20 µl y se almacenaron a -80°C hasta que estuvieron listos para la transfección de las células. La integridad y concentración de los transcritos de ARN se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa. Se estimó que cada alícuota de 20 µl contenía ARN viral con longitud del genoma suficiente para permitir la transfección de 0,4-1 x 10⁷ células Vero certificadas para la producción mediante electroporación.

25 La transfección de cada transcripto de ARN a células WCB-Vero se llevó a cabo en las instalaciones cGMP en Shantha Biotechnics. Los transcritos ARN de DENVax se descongelaron, se mezclaron con 400 µl de la suspensión de células Vero (1 x 10⁷ células/ml) y se transfirieron a una cubeta de electroporación pre-congelada estéril (con espaciamiento de 4 mm) para la electroporación mediante un sistema total Gene Pulser Xcell (BioRad Laboratories). Cada muestra se pulsó una vez a 250V/∞ Ohm/500µF y se incubó durante 10-15 min a temperatura ambiente, se transfirió a un matraz de 75 cm² que contenía 30 ml de medio de crecimiento celular (MEM con FBS al 10%), y se incubó a 36°C ±1°C, CO₂ al 5% durante 6 a 11 días. El medio de cultivo se cosechó, clarificó mediante centrifugación, se estabilizó y se almacenó en alícuotas pequeñas debajo de -60°C. Los títulos virales de las provisiones de partida de vacunas candidatas (denominadas P1 por el pase a nivel 1) resultantes de la transfección se determinaron mediante un ensayo de titulación de placa en células Vero y se utilizaron para propagación futura de las semillas DENVax.

Fabricación de las semillas de virus DENVax

40 Las semillas de virus P1 se utilizaron para propagar los lotes de las semillas del virus pre-maestras, maestras, de trabajo y en masa de DENVax a través de una estrategia diseñada para garantizar la estabilidad genética óptima y la seguridad de los lotes manufacturados. Esta estrategia incluyó tres purificaciones seriadas en placa, así como análisis genéticos de los virus a varios niveles de pasos para seleccionar las poblaciones de virus clonales óptimas para una producción continua de semillas (Tabla 1). En forma resumida, las semillas P1, cosechadas de las células transfectadas se amplificaron una vez mediante infección de células Vero a una MOI de 0,001 para generar las semillas P2. Las alícuotas de las semillas P2 se evaluaron por morfología de placa y secuenciación genómica viral completa. Las provisiones de partida de P2 genéticamente confirmadas se sembraron en células Vero en monocapas con un medio descrito en la sección de titulación de placas posteriormente, para generar placas bien aisladas. Después de visualizar con rojo neutro, se aislaron seis placas individuales de cada uno de los 4 serotipos de virus de vacuna (placas de clones A a F) y se mezclaron con 0,5 ml de medio de cultivo (Pase P3). Cada una de las seis suspensiones de placas fue sometida a dos rondas adicionales de purificación de placas, que dieron como resultado semillas de virus purificadas en placas y tres veces en los pasos P4 y P5 respectivamente. Los virus P5 se amplificaron a través de dos pasos secuenciales en Vero para producir provisiones de partida de semillas P7.

55 El análisis genético de los tres loci de atenuación principales de DENVax se llevaron a cabo empleando secuenciación puntual y/o un ensayo de mutación mediante amplificación de emparejamientos erróneos basado en Taqman (TaqMAMA) previamente descrito y un análisis de fenotipo de placa para seleccionar las 24 semillas P7. Las semillas que poseían las características iniciales apropiadas fueron caracterizadas mediante secuenciación genómica completa. Como resultado de estos análisis, una de las 6 semillas P7 (clones A-F) de cada serotipo DENVax se seleccionó para que fuera la semilla pre-maestra basándose en la presencia de mutaciones atenuantes DENV-2 PDK-53, alteraciones en la secuencia genómica mínimas y fenotipo de placa esperado. Cada semilla pre-maestra seleccionada se expandió hasta una semilla de virus maestra (MVS o P8) empleando un pase de una vez del virus a una MOI de 0,001 en múltiples matraces de 175 cm² de células Vero. Excepto por la MVS de DENVax-4, las semillas de virus maestras se cosecharon a

los 8-10 días post-infección (pi). Las provisiones de partida de MVS se cosecharon 6-10 días post-infección (pi), se clarificaron por centrifugación, se estabilizaron mediante la adición de una solución de sacarosa/fosfato/glutamato (concentración final de 7,5% de sacarosa, dihidrogenofosfato de potasio 3,4 mM, hidrogenofosfato de dipotasio 7,2 mM, glutamato monosódico 5,4 mM, respectivamente) y FBS de 0,95 a 1,90% (concentración final). La MVS de DENVAx-4 se preparó de forma diferente para optimizar su rendimiento. De forma resumida, se infectaron múltiples matraces de células con la semilla pre-maestra de DENVAx-4 a una MOI de 0,001 en presencia de F-127™ al 0,1%, poloxámero 407 (se han evaluado otros copolímeros en bloque de OE-OP y pueden sustituirse aquí, véase la patente expedida) que se ha demostrado aumentan la estabilidad térmica del virus DENV. Los medios infecciosos se cosecharon 6-10 días pi y se estabilizaron con FBS al 17% (concentración final), se agruparon y se congelaron. Las cuatro provisiones de partida de MVS de DENVAx se almacenaron en alícuotas de 1 ml por debajo de -60°C.

Las semillas de virus de trabajo de DENVAx (WVS) se prepararon mediante un pase de una vez en un cultivo de células Vero de la MVS a una MOI de 0,001. Los procedimientos fueron similares a la producción de MVS, con la excepción de que fueron cultivadas en factorías celulares de capas múltiples (6360 cm^2). Las provisiones de partida de WVS se filtraron a través de filtros de 10 μM y 0,45 μM , se estabilizaron con los mismos estabilizantes empleados para las MVS y se tomaron alícuotas de 30 mL en botellas de PETG o en crioviales de 2,0 mL y se almacenaron por debajo de -60°C.

En algunos métodos las semillas de virus en masa (BVS) se produjeron mediante infección de múltiples factorías celulares (6360 cm^2 cada una) con células Vero confluentes con 90 mL de WVS diluidas para obtener una MOI de 0,001. Un medio empleado para dilución de los inóculos de WVS contenía F-127™ al 0,1% sin suero. Después de 1,5h de adsorción, las células se lavaron 3 veces con PBS y se añadieron 800 mL de medio DMEM libre de suero a cada factoría celular y las factorías se incubaron con $36(\pm 1)^\circ\text{C}$ en CO_2 al 5($\pm 0,5$)%. Despues de incubar durante cuatro días, se recolectaron pequeñas alícuotas del medio para realizar pruebas de esterilidad. Los virus se cosecharon entre los días 5 y 10 pi y se clarificaron inmediatamente por filtración a través de un filtro de tamaño de poro de 0,45 um y 1L de cada colección de virus clarificados se estabilizó mediante adición de 500 ml de solución tampón 3x FTA (concentraciones finales de trehalosa 15%, poloxámero 407 Pluronic® F-127™ 1,0%, albúmina humana USP 0,1% en PBS, pH 7,4). El virus estabilizado se distribuyó en botellas de 1 L de PETG y se almacenó congelado por debajo de -60° para una posterior agrupación y realización de pruebas de control de calidad. Todas las cosechas de virus estabilizados con un título viral de más de 10^5 UFP/ml y un nivel aceptable de ADN residual se descongelaron rápidamente en un baño de agua a 32°C , a continuación, se reunieron y mezclaron bajo condiciones de asepsia. Cada BVS monovalente agrupada se distribuyó en contenedores de PETG etiquetados y se almacenó por debajo de -60°C para su uso posterior.

Controles de calidad del producto de fabricación

Las semillas MVS, WVS y BVS fueron evaluadas para determinar su identidad, esterilidad y agentes adventicios detectables. La identidad de cada provisión de partida de vacuna se confirmó mediante RT-PCR con cebadores de DENVAx específicos de serotipo. Los fragmentos de ADNc amplificados contenían un sitio de empalme químico E/NS1 que permitía la identificación de cada uno de los cuatro serotipos de DENVAx. Cada semilla fue sometida a prueba empleando las reacciones de RT-PCR específicas de los 4 serotipos para confirmar la identidad viral y la ausencia de contaminación cruzada con serotipos de DENVAx heterólogos. La prueba de esterilidad se realizó de acuerdo con USP 71 (United States Pharmacopeia o Farmacopea de los Estados Unidos, sección 71). Se realizaron pruebas para Micoplasma.

Las siguientes pruebas *in vitro* e *in vivo* para detectar contaminación viral se realizaron empleando cosechas de DENVAx no clarificado y no estabilizado, recolectado durante la fabricación de las semillas. Los medios infecciosos cosechados se neutralizaron en primer lugar con antisiero policlonal de conejo para DENV (Inviragen) a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 1h para inactivar el DENV. Para las pruebas *in vitro*, las semillas neutralizadas se inocularon a tres líneas celulares indicadoras, MRC5, VERO y MA104 en matraces de 25 cm^2 . Los echovirus (control CPE) o virus de paperas (control de hemoadsorción) se emplearon como un control positivo de CPE o de hemoadsorción, respectivamente. Se realizó un seguimiento diario del CPE en todas las células durante un total de 14 días. Al final de los 14 días el sobrenadante del cultivo se eliminó y se reemplazó por una solución de 10 mL de glóbulos rojos (RBC) de cobaya (3 mL de RBC de cobaya al 0,5% en solución salina tamponada con fosfato preparada con 10 mL de medio de crecimiento de células). Los matraces se incubaron a continuación a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ durante 30 minutos seguido de una incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las monocapas se lavaron con PBS y se observaron bajo una amplificación 10X buscando la presencia de grumos en forma de estrella de hemoadsorción de RBC.

Las pruebas *in vivo* de agentes adventicios se realizaron en ratones lactantes, ratones post-destetados y cobayas. A los ratones lactantes se les inocularon 0,1 ml o 0,01 ml (10 ratones en cada grupo de dosis) de la muestra de semilla neutralizada con antisiero para DENV mediante una inyección intraperitoneal (ip). De forma similar, a cada uno de los 10 ratones post-destetados se le inocularon vía ip 0,5 mL o 0,03 mL de la muestra. A cada una de las cobayas (5/grupo) se le inocularon vía ip 5,0 mL. La morbilidad y la mortalidad de los ratones

lactantes fue observada a diario durante un total de 14 días después de la inoculación. Los ratones postdestetados fueron observados durante un total de 28 días y las cobayas fueron observadas durante un total de 42 días después de la inoculación. Los artículos de prueba cumplieron con los criterios de aceptación si ≥80% de los animales que recibieron la inoculación permanecieron sanos a lo largo del periodo de observación.

5

También se realizaron pruebas *in vivo* de contaminantes en huevos de gallina embrionados. Para cada muestra, a 10 huevos de gallina embrionados (9 días de edad) se les inocularon 0,5 mL de la muestra neutralizada con antisuero para DENV en el fluido alantoideo y se incubaron a 35°C durante 3 días. Los fluidos alantoideos de estos 10 huevos se cosecharon, reunieron y pasaron al fluido alantoideo de 10 huevos embrionados de nueva aportación (10-11 días de edad; 0,5 mL/huevo) y se incubaron a 35°C durante 3 días más. De forma similar, para cada muestra, a 10 huevos embrionados (6-7 días de edad) se les inocularon 0,5 mL por huevo (BVS monovalente de DENNVax-2) o 0,25 mL por huevo (BVS de DENNVax-1, DENNVax-3 y DENNVax-4) mediante inyección al saco de la yema y se incubaron a 35°C durante 9 días. Los sacos de la yema de estos 10 huevos se cosecharon y agruparon y se pasó una suspensión al 10% en los sacos de la yema de 10 huevos embrionados de nueva aportación (6-7 días de edad; 0,5 mL/huevo) y se incubaron a 35°C durante 9 días más. Se observó la viabilidad después de 3 días de incubación de los huevos que recibieron la inoculación en el fluido alantoideo (inoculaciones tanto iniciales como de pase). Ambas reservas de fluido alantoideo se sometieron a prueba para determinar la actividad de hemaglutinación empleando eritrocitos tipo O de gallina, cobayas y seres humanos a 4°C y 25°C. Se observó la viabilidad de los huevos que recibieron la inoculación en el saco de la yema (inoculaciones tanto iniciales como de pase), después de 9 días de incubación.

Ensayo de placas de virus y ensayo de inmunofoco

25

Los títulos virales fueron medidos mediante ensayo de placa o ensayo de inmunofoco empleando células Vero. Los ensayos de placa se realizaron en capas dobles superpuestas de agarosa en placas de seis pocillos de células Vero confluentes, como se ha descrito previamente, y también se emplearon para evaluar los fenotipos de placa de las semillas DENNVax. Para tener una comparación precisa, se midieron y compararon los tamaños de placa de todos los virus en el mismo experimento. Después de visualizar con rojo neutro las placas aisladas el día 9 pi, se midió el tamaño de hasta 10 placas bien aisladas para calcular el tamaño de placa promedio. Se midieron menos placas para DENNV-1, -3 y -4 wt, cuyo mayor tamaño de placa no permitió frecuentemente la medición de 10 placas bien separadas.

35

Debido a que DENNVax tetravalente contiene todos los serotipos de DENV, se desarrolló un ensayo de inmunofoco específico a serotipo de DENV para cuantificar cada componente DENNVax en las formulaciones tetravalentes. Los ensayos de inmunofoco de cada MVS de DENNVax individual se compararon con los ensayos de placa para garantizar que los resultados de titulación de virus fueran comparables entre ambos ensayos. Los ensayos de inmunofoco se llevaron a cabo en placas de 6 pocillos de células Vero confluentes, infectadas con virus diluidos de forma seriada. Las células se cubrieron con un medio salino equivocado (BSS/YE-LAH) que contenía carboximetilcelulosa de alta viscosidad (Sigma) al 0,7% y se incubaron durante 7 días a 37°C con CO₂ al 5%. Después de eliminar las capas superpuestas, las láminas de células se lavaron 3 veces con PBS, se fijaron con acetona al 80% fría durante 30 min a -20°C, se lavaron una vez con PBS y se bloquearon con un tampón de bloqueo que contenía leche seca sin grasa al 2,5% (p/v), Triton X-100 al 0,5% y Tween-20 al 0,05% en PBS a 37°C durante 30 min. Las células bloqueadas se incubaron con MAb específicos de serotipo de DENV diluidos, 1F1 (DENNV-1), 3H5 (DENNV-2), 8A-1 (DENNV-3) o 1H10 (DENNV-4) en el tampón de bloqueo a 37°C durante 1 h o 4°C durante la noche, se lavaron 3 veces con tampón de lavado (Tween-20 al 0,05% en PBS) y se incubaron con anti-IgG de ratón de cabra purificada por afinidad conjugada con fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante (HRP) (Jackson Immuno Research Laboratories) a 37°C durante 45-60 min. Las placas se lavaron 3 veces antes de añadir el sustrato apropiado, NBT/BCIP de 1 etapa más supresor (Pierce) para fosfatasa alcalina o kit Vector-VIP (Vector Labs) para HRP, para el desarrollo de color. El desarrollo de color se detuvo lavando con agua cuando los focos se desarrollaron por completo. Los inmunofocos teñidos se visualizaron directamente y se contaron empleando una caja de luz.

Secuencia genética

55

Se secuenciaron los genomas de longitud completa de las MVS y WVS (véase más abajo). En resumen, el ARN viral se extrajo de las semillas de DENNVax empleando el kit QIAamp de ARN viral (Qiagen) y los fragmentos de ADNc solapantes que cubrían el genoma completo, se amplificaron empleando un kit de RT-PCR Titan One Tube (Roche Applied Science, Inc.). Los fragmentos ADNc se purificaron en gel antes de secuenciarlos empleando cebadores tanto directos como inversos empleando el kit de secuenciación Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems). Las reacciones de secuencia se limpiaron empleando el kit BigDye XTerminator Purification (Applied Biosystems) y se ejecutaron en el analizador 3130xl Genetic (Applied Biosystems) en DVBD/CDC. Se utilizó el soporte lógico Lasergene SeqMan (DNAStar, Inc.) para realizar el análisis del genoma y su comparación.

65

Ensayo de mutación por amplificación de emparejamientos erróneos basado en Taqman (TaqMAMA)

El ensayo TaqMAMA es un ensayo de polimorfismos de un solo nucleótido sensible, cuantitativo, desarrollado para permitir una evaluación más fina del nivel de reversión en el locus de atenuación 5'NC-57, el cual fue optimizado en este estudio. El ARN viral extraído de MVS y VVS se analizó mediante TaqMAMA empleando ambos conjuntos de cebadores/sonda Taqman que son específicos para wt o la región 5'NC-57 de la vacuna. Los cebadores directos utilizados para detectar DENV-2 wt y las secuencias de vacuna fueron D2-41-GC y D2-40-TT, respectivamente. El nucleótido terminal 3' de cada cebador directo correspondió al nucleótido específico 5'NCR-57 para cada virus, mientras que el nucleótido adyacente al nucleótido terminal 3' en cada cebador difirió de la secuencia genómica viral de DENV-2 para aumentar el efecto de emparejamiento erróneo. El cebador inverso, CD-207 y la sonda Taqman, CD-169F para los conjuntos wt y de vacuna, fueron idénticos. Las secuencias de los cebadores y la sonda, así como las condiciones de ciclación se describieron previamente. Se realizó una RT-PCR en tiempo real para el sistema iQ5 o CFX-95 (BioRad) utilizando un kit BioRad iScript RT-PCR (para las sondas) en una reacción de 25 µl que contenía 5 µl de un molde de ARN viral, 0,4 uM de cada cebador y 0,2 uM de la sonda. Se llevaron a cabo reacciones por triplicado para cada ensayo específico de wt y de vacuna para cada muestra. La determinación del número de copias del genoma se realizó con respecto a una curva patrón preparada para cada genotipo viral, en donde los patrones de ARN fueron transcritos obtenidos a partir de plásmidos que contenían los nt 1-2670 de cada ADNc específico de genotipo. Adicionalmente, el ensayo de especificidad se confirmó evaluando cada patrón de ARN con el conjunto de cebador/sonda de genotipo heterólogo para garantizar un mínimo de reactividad cruzada en cada experimento. Se informó de los resultados como porcentaje de genomas virales que mostraban reversión. Previamente, debido a la mayor cantidad de reacciones cruzadas de fondo que limitaban los niveles de entrada de ARN para este ensayo, la sensibilidad de detección original constituía aproximadamente 0,1% de reversión (poder de discriminación). Desde entonces, el ensayo se ha optimizado adicionalmente empleando equipo de PCR en tiempo real mejorado y kits de reacción, y se disminuyeron considerablemente las reacciones cruzadas de fondo a niveles mucho más altos (copias a 7-8 log₁₀) de entrada de molde de ARN. Esta optimización dio como resultado una mejora significativa de la sensibilidad de detección, de hasta 0,01-0,07% de reversión.

Replicación viral en células de mosquito C6/36 y sensibilidad a la temperatura en células Vero de mamífero

Los fenotipos de replicación de las cuatro provisiones de partida de MVS de DENVAx y los virus DENV-1, -2, -3 y -4 wt, fueron evaluados en células de mosquito C6/36 (*Aedes albopictus*). Las células C6/36 cultivadas en placas de 6 pocillos se infectaron por duplicado con cada uno de los virus a una MOI de 0,001 y se incubaron con 4 mL/pocillo de medio DMEM que contenía FBS al 2% en una incubadora con CO₂ al 5% a 28°C. Se recolectaron pequeñas alícuotas del sobrenadante del cultivo para cada virus el día 6 pi, se mezclaron con un volumen igual de un medio que contenía FBS al 40%, se almacenaron a -80°C hasta que estuvieron listas para la titulación de las placas de virus.

La sensibilidad a la temperatura se realizó mediante comparación del crecimiento viral a 39°C vs el crecimiento a 37°C a los 5 días pi de células Vero en placas de 6 pocillos. Las células se infectaron por cuadruplicado con cada uno de los virus a una MOI de 0,001 a 37°C. Despues de la adsorción del virus, los cultivos infectados se incubaron con 4 mL/pocillo de medio DMEM que contenía FBS al 2% en 2 incubadoras separadas con CO₂ al 5%, una ajustada (placas duplicadas) a 37°C y la otra a 39°C. Se recolectaron alícuotas (50 µl) del sobrenadante del cultivo el día 5 pi, se mezclaron con un volumen igual de DMEM que contenía 40% de FBS y se almacenaron a -80°C hasta que estuvieron listas para la titulación de las placas del virus. Las temperaturas de la incubadora se calibraron empleando termómetros calibrados en planta trazables a NIST (-1 a 51°C; ERTCO).

Infección, diseminación y transmisión en mosquito

Los mosquitos *Aedes aegypti* empleados para el estudio fueron de una colonia establecida en 2002 de una villa cercana a Mae Sot (16°N,33'E), en Tailandia. Despues deemerger de la larva, los mosquitos adultos se mantuvieron a 28°C empleando un fotoperiodo 16:8 (luz:oscuridad) con una solución de sacarosa al 10% proporcionada *ad libitum*. Se emplearon mosquitos hembra de cinco a siete días de edad para ser alimentadas con harina de sangre infecciosa o para inoculaciones intratorácicas (IT). Las alícuotas de cultivos de nueva aportación de DENVAx y DENV wt se emplearon inmediatamente después de la cosecha (sin emplear ciclos de congelación-descongelación) para generar harinas de sangre para virus, como está indicado previamente para lograr una infección oral. El resto del sobrenadante del virus se complementó con FBS hasta alcanzar una concentración de 20% y las alícuotas se almacenaron a -80°C para posterior titulación de las placas de virus y experimentos de inoculación IT. Las semillas de DENVAx recién preparadas para estos experimentos se amplificaron a partir de semillas pre-maestras en células Vero y se consideraron equivalentes a MVS de DENVAx.

Las harinas de sangre infecciosa se prepararon mezclando virus de nueva aportación a una proporción 1:1 con sangre de pollo desfibrinada (Colorado Serum Company) el mismo día de la infección oral. Los mosquitos se dejaron sin alimento de azúcar durante la noche y a continuación se les ofreció la mezcla de virus:sangre durante 1h empleando un sistema de alimentación de membrana Hemotek (Discovery Workshops). Se

conservó una alícuota de 50 µl de harina de sangre a -80°C para una nueva titulación de las dosis de virus. Las hembras completamente ingurgitadas se clasificaron bajo anestesia en frío y se colocaron en cajas con una solución de sacarosa al 10% proporcionada ad libitum. Las cajas se colocaron a 28°C con un fotoperiodo de 16:8h (luz: oscuridad). Después de 14 días, 25-30 mosquitos de cada grupo de virus se anestesiaron vía exposición a trietilamina (Flynap®, Carolina Biological Supply Company) y se eliminó una pata posterior y se colocó en 0,5 mL de DMEM con FBS al 10% y penicilina/estreptomicina al 5% (100U/ml y 100 ug/ml respectivamente). La saliva se recolectó insertando la proboscide del mosquito anestesiado en un tubo capilar que contenía FBS al 2,5% y solución de sacarosa al 25%. Se permitió que los mosquitos salivaran al menos durante 15 minutos y a continuación, los tubos capilares y los cuerpos se colocaron en tubos separados que contenía DMEM. Los cuerpos, patas y saliva de los mosquitos se almacenaron a -80°C hasta que se trituraron y evaluó la infección viral. Para la inoculación IT, los mosquitos se anestesiaron en frío y se les inocularon aproximadamente 50 ufp de virus en un inóculo de 0,34 µl. Los mosquitos que recibieron a inoculación se mantuvieron durante 7 días en las mismas condiciones descritas más arriba. Los mosquitos se anestesiaron a continuación y su saliva y sus cuerpos se recolectaron como se describió previamente. Las muestras se almacenaron a -80°C para su procesamiento posterior.

Para procesar las muestras para la titulación viral, las muestras de cuerpos y patas se homogeneizaron con BBs con revestimiento de cobre (Crossman Corporation, NY) a 24 ciclos/segundo empleando un molino de mezclado durante 4 minutos y a continuación, se clarificaron por centrifugación a 3.000 x g por 3 min. Las muestras de saliva se centrifugaron a 3.000 x g durante 3 minutos para expulsar el fluido de los tubos capilares. Se evaluó la presencia de virus infeccioso por ensayo de placa de los productos homogeneizados de los cuerpos y las patas y muestras de saliva diluidas diez veces. Los resultados de cuerpos, patas y saliva se emplearon para determinar las tasas de infección, diseminación y transmisión, respectivamente.

25 *Neurovirulencia en ratones*

Los ratones ICR con embarazo programado fueron obtenidos de los laboratorios Taconic y se controlaron varias veces cada día para determinar el tiempo aproximado de nacimiento de las camadas de crías. En un experimento dado, aproximadamente 12-24h después del nacimiento, se sensibilizaron dos camadas de ocho crías por virus (n=16) con 10³ a 10⁴ ufp de virus en 20 µl de diluyente vía intracranial (ic) empleando una aguja de calibre 30. Los animales se controlaron al menos 3 veces al día al menos durante 32 días después de la sensibilización. Al primer signo de enfermedad (pelo áspero, espalda jorobada, pérdida de peso, movimiento anormal, parálisis o letargia) los animales fueron sometidos a eutanasia por anestesia letal con gas isoflurano, seguido de dislocación cervical. El día de eutanasia posterior a la infección representó "el tiempo hasta la enfermedad/morbilidad" o el "tiempo de supervivencia" del animal. Los experimentos con animales se llevaron a cabo siguiendo un protocolo para animales aprobado por DVBD/CDC IACUC.

Obtención de virus semilla maestra

40 Semilla de virus maestra (MVS) de DENVax-1

En el presente documento se proporcionan la secuencia de nucleótidos del genoma de virus químérico (SEQ ID NO: 13 en la lista de secuencias) y la secuencia de aminoácidos deducida de la proteína traducida (SEQ ID NO: 3 en la lista de secuencias). La mayor parte del gen prM-E (nt 457 a -2379, subrayado) es específico del virus DEN-1 16007 de tipo salvaje (wt); el resto del genoma es específico del virus DEN-2 PDK-53. Se marcan todas las sustituciones modificadas mediante ingeniería genética que difieren del virus wt (D1 16007 o D2 16681), así como las mutaciones extra (cambios del clon de ADNc modificados mediante ingeniería genética) detectadas en la MVS.

50 Sustituciones incluidas en el genoma y la proteína:

Sítios de unión entre la cadena principal D1 (prM-E) y D2:

- a. M1ul (nt 451-456); mutación silenciosa modificada mediante ingeniería genética, nt-453 A G.
- b. NgoMIV (nt 2380-2385): mutaciones modificadas mediante ingeniería genética, nt-2381/2382 TG a CC (dieron como resultado el cambio E-482 Val-a-Ala)

Cadena principal del virus D2PDK-53 (cambio de wt D2 16681): todo en negrita

- a. Región 5'-no codificante (NCR)-57 (nt-57 C a T): locus principal de atenuación (en color rojo)
- b. NS1-53 Gly-a-Asp (nt-2579 G-a-A): locus principal de atenuación (en color rojo)
- c. NS2A-181 Leu-a-Phe (nt-4018 C-a-T)

ES 2 965 652 T3

- d. NS3-250 Glu-a-Val (nt5270 A-a-T): locus principal de atenuación (en color rojo)

e. nt-5547 (gen NS3) mutación silenciosa T-a-C.

5 f. NS4A-75 Gly-a-Ala (nt-6599 G-a-C)

*nt-8571 mutación silenciosa C-a-T de PDK-53 no está modificada mediante ingeniería genética en el virus de vacuna

10 DEN-1 prM-E (cambio de wt D1 16007)

a. nt-1575 modificado mediante ingeniería genética mutación silenciosa T-a-C para eliminar el sitio XbaI nativo

15 Sustituciones adicionales encontradas en la semilla de vacuna (0,03%nt diferentes del clon original)

a. NS2A-116 Ile-a-Leu (nt-3823 A-a-C, en negrita)

b. NS2B-92 Glu-a-Asp (nt-4407 A-a-T, en negrita)

20 c. Nt-7311 mutación silenciosa A-a-G (en negrita)

RDR-87-Y, locus de atenuación D2 PDK-53 (D2 16681 wt: C)												>C	
>Región 5'-No Codificante													
10	20	30	40	50	60	70	80	90	100				
A	G	T	G	T	T	A	G	T	C	T	G	A	T
M	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200				
A	T	A	C	C	C	G	A	A	A	T	T	C	T
T	A	T	C	T	T	G	C	A	C	A	T	G	A
N	Q	R	K	K	S	K	N	T	P	F	V	M	L
N	Q	R	K	K	S	K	N	T	P	F	V	M	L
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300				
T	G	G	A	G	G	T	T	G	A	G	G	T	T
C	G	A	T	T	C	T	C	T	A	T	T	C	T
G	M	L	Q	G	R	G	P	L	K	L	F	M	A
G	M	L	Q	G	R	G	P	L	K	L	F	M	A
310	320	330	340	350	360	370	380	390	400				
A	G	T	A	F	L	R	F	L	T	I	F	P	T
T	A	G	T	A	F	L	R	F	L	I	F	P	T
A	G	T	A	F	L	R	F	L	T	I	F	P	T
G	T	A	G	T	A	F	L	R	F	L	I	F	T

ES 2 965 652 T3

ES 2 965 652 T3

CCCGATAGTCACtgacaaAGaaaaaccAGtcaatattggagccagaaccacccTTGGTGAG>tacatcgtsGTAGGAGCAGGTGAAGAGCTTGAAA
P I V T D K E K P V N I E A E P F G E S Y I V V G A G E E K A L K
2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170 2180 2190 2200
CTAAGCTGGTTCAAGAAAGGAGGCAGCATAGGGAAAATCTTGGAGCTACTGCCCCAGGGACCGAGGAATGCCGATCTGGGAGAGCACCCGATGGGACT
L S W F K K G S S I G K M F E A T A R G A R R M A I L G D T A W D F
2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280 2290 2300
TCGGTTCTATAAGGGAGGTTGTTCACTCTATGGGAAACTGCTACACCCAGGTTTGGAACTGCAATATGGAGTTTGTAGCAGAGTTCTGGACCAT
C S I G G V F T S M G K L V R Q V F G T A Y G V L F S G V S W T M

ES 2 965 652 T3

Fin de la Secuencia de D1 16887

```

2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400
GAAATTTGGAAATGGATTTCGTCACATCTTACGTTTAATTCAAGGACAGGTCCATTCTGATTTGATGAGTCATCCTGACCGGCCATTCCTGAGCTGCTGATGAT
T C G T G C T T G T L T T T C T T S S T T S T S M C T T A G S V I T T Y

```

Série de embalagem Nro. IV modificado periódicamente - E-437 Vol. 3 Ata Int. 23812382 TG a CG

>NS1
 2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480 2490 2500
 TTGGGAACTCAAGGTGTCAGCCCGATAGTCTTGCGTTTGACTGGAAAAACAAAGAACGTTGAACTGGCATTTCTGACACASACAACTGACAA
 S G Y K V Q A C S G C V V S W K N K S L N C G S G I F I Y D K V S T

 2510 2520 2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590 2600
 CATGGCAGAGACRATCAGTTCCAAACGAGATGTCUCCYTCAARACTGCTTCAGGTCATCCAGAAGGCGCATGAGAGGCAATTGTCGGAACTGCCCTGAGT
 W T K Q Y K F Q P R S F S X L A S A I G R A R E S I C G I R S V

Locus de atenuación D2 PDK-53 NS1-53-Asp (wt D2 16681; Gly, nt-2579-G)

3710 3720 3730 3740 3750 3760 3770 3780 3790 3800
TTGCCCTACTAGCGACCTTCAAGTGACGCAACTTTCGCGCGGACTACTCTTGACGAAAGCTGACCTCCAGGAATTGTGATGATGCTACTATAGGAT
A L S A R F K V R P T F A A G L E L L R R L T S X E E L M M T T I G I

3810 3820 3830 3840 3850 3860 3870 3880 3890 3900
 TGTATTCCTGCCCGACGAGCCTTACCCAGACGCGTTGACTGAACTGATGCCCTGGGCTTGATGCTCCGAAAATGGTGCAGAATAATGCGAA
 V L L S Q S T L P E T I D E L T D A L S I G M N V L K N V R H M S

Mutación NS2A-116 Ile a Leu (nt3823 A a C) adicional en semilla maestra y pre-maestra

ES 2 965 652 T3

4910 4920 4930 4940 4950 4960 4970 4980 4990 5000
TTCCTGCTTCCCCATGGTTTAAACATCCCTACAGCCAAAAACAGATTGTATACCGATTGATTGAGGATCAAGGCTCTCAACAGTTATTTCT
S V S P L F I T S S Q Q K T D W I P I A L T I R G L N S T A I F L

NS2A-181-Phe específicas de D2 PDK-53 (D2 18881 wt; Leu, nt 48(S-C))

Mutación NSTR-32 Glu 3 Asp (nt 4487 A > T) adicional (en semilla maestra y pre-maestra)

>NS83
 4810 4820 4830 4840 4850 4860 4870 4880 4890 4900
 TCCGAACTGAAGCAGACGCCCGGGCGATTTCTGGATGTTCCCTAACCCCAACCTGGAAAGCTGAACTOXAAGTGAGCCTATAGAATTAGC
 N E V K S Q R A G V L W D V P S P F P M G K A R L E D G R Y R I K Q
 4910 4920 4930 4940 4950 4960 4970 4980 4990 5000
 AAAACGGGTTCTTGGATTTCTCCAGATCGGGGGGGATTTCAACAGGACATTACAAATGTGGCATGTCACGGGGGGCTGTTCTATGCA
 N G I L G Y S Q I G A C V T K B G T F H P M M H V T R G A V E M K
 5010 5020 5030 5040 5050 5060 5070 5080 5090 5100
 TAAAGGAAAGGATGATTAACCTATGCGGGGGGTTCAAGGAGGATTTCTATGTCAGGGGGGGCTTAACTGGGAGGATGTCAGGAGGAGA
 K G K R I E P S W A D V K N D L I S Y G G G W K L E G E W X S G E
 5110 5120 5130 5140 5150 5160 5170 5180 5190 5200
 GAGGTCCTGGATTTGGCACTGGAGGAAATGGAAAGGAAATGGAGGAAATGGCTGAAACGGAACTCTGGCTTCAAAACCCAGGCGGAACTTGCTGCTTATI
 S V Q Y D A L K F G K N P R A V Q T N E G L F K E H A G T I S G A V S
 5210 5220 5230 5240 5250 5260 5270 5280 5290 5300
 CTCTGGACTTTCTCTGAAAGGCTGAGGATCTGAAATTCGGCAAGGAAAGGAACTGGCTTCTTCTGCTTATGCTTGTGTTACACGGCTGGCGGC
 L D F S P G T S G S P I I D K X K G E V V G L Y G N G V V T R S G A
 5310 5320 5330 5340 5350 5360 5370 5380 5390 5400
 ATATUTGAGCTCTTAGCCCCAGACTGAAAAGAGUUTGGAAAGCAACCCAGAGGTCGAGATGCACTTTTCCGAAAGAGAGAGACTGACCATCATGGACCTC
 Y V S A I A Q T E R S I D N P S I E D O I F R K M R L T I M D I
 5410 5420 5430 5440 5450 5460 5470 5480 5490 5500
 S100 S110 S120 S130 S140 S150 S160 S170 S180 S190 S200
 CGGCCAGGGAGCGGAGAGGAGAGGAGCTTCCGGGCGACATAGTCAGAGAGCTGGGGTTGAGAGACATTCATGCGGGGGACTGAGGTTG
 H P G A G K T K R Y L P A I V R E A I K R G L R T L I L A P T R V V
 5510 5520 5530 5540 5550 5560 5570 5580 5590 5600
 5610 5620 5630 5640 5650 5660 5670 5680 5690 5700
 TGGCGGCTGAAATGGCGGAGAGGAGCTTCCGGGCGACATAGTCAGAGAGCTGGGGTTGAGAGACATTCATGCGGGGGACTGAGGTTGAGGTTGACCTTAAT
 A A K E M S E R A L H C L P I R T Q T P A I R A V X T G R E I V D L M

Foco de estenación NS3-230-V-3 de IV PDK-51 (D2) 19881 est. Glu-est 5370-4

6310 6320 6330 6340 6350 6360 6370 6380 6390 6400
 STOTCAGTCACATTATTTACCTTGAGGCGTGGCTATCACCCGTTTGTGAGTGGCCRAACTRCACCTCTGTTTCACTGEMGRAAAGGCCAATTCAGGCCAGCAGT
 C S A T F T M R L L S P V R V P N Y S L I I W D E A E F P D P A S

5410 5420 5430 5440 5450 5460 5470 5480 5490 5500
 ATAGGCACTTGAGGTTCTACGATCAGTCAGTGGAGATGCGGTGAGCCGAGCTGAGTTATGACAGGCGACTCCCGGGGAGCAGGACCAATTTCCTC
 T A A S G X I S T R V E M G K M A G I N M T A F P S G S S D P F E Q

```

5516      5520      5530      5540      5550      5560      5570      5580      5590      5600
AAGGCGATGACCCGATCAGATGAGGAAAGGAGGAACTGCCGAAACGGCGTGTGCGAATGCGTCCGACATGATGATGGTGACCGGAAACTGTTTC

```

Materiale tilgjengelig fra R3 PDFX 63-15547/C (R3 15547-1-1-3)

ES 2 965 652 T3

5610 5620 5630 5640 5650 5660 5670 5680 5690 5700
 CTCGCGTTCGCAAGTATAAACGCCAATATGATAACGCTTGCGTGGCGAAATGGAAAGGAAAGCAGTACAACTTCGACTTGCAGCTTCGAG
 F V P S I K A G N D I A A C L B X N G K K Y I Q L S R X T F D S R

 5710 5720 5730 5740 5750 5760 5770 5780 5790 5800
 TATGTCTGAGACTGAGBACGATGATTGCGCTGCGTGGCTGAACTGACGTTTCGAGAAATGGCGGCGGCGGTTTACAGCGCCGCGAC
 K V H T R T N D W D F V V E F D I S B X G A N F K A S R V I D F R R

 5810 5820 5830 5840 5850 5860 5870 5880 5890 5900
 CGTGCATGAACCGACTCATACTACAGATGGTGAAGCGGGGAAATTGGCGAGGAGCTATGGCGAGCTGACCGACTGAGTACGGAC
 C M K P V I L T D G E E R V I S A G F M F V T E S S A A A Q R R G R

 5910 5920 5930 5940 5950 5960 5970 5980 5990 6000
 ATATGGAGARATCCRAAATGAGATGCGCACTACATAPACATGGGGGAACTCCTGGAGAATGATGAGACTGCTGCGACACTGGAAAGGAGCTAAATG
 L G R N P X N E X D Q Y I Y N G X P L E N O S D C R S W K E R S M

 6010 6020 6030 6040 6050 6060 6070 6080 6090 6100
 CTGCTAGATASCTCAGACGCGTACGAGCTTCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAG
 L L D N I H T P E G I I P S M F E P S R E K V D R I D G E I R L R G

 6110 6120 6130 6140 6150 6160 6170 6180 6190 6200
 GAGAGACCGGAAACCGCTTGTGAGACTTAAATGAG
 E A R K T F V D L M R R G D L F V W I A Y R V A A E G I N Y A D R

 6210 6220 6230 6240 6250 6260 6270 6280 6290 6300
 AGGCTGTTGTTGATGAGCTAACGAGACGAGCTAACGAG
 R N C F D G V R N N Q I S E E H V S V E I W T K X G S R K X L S F

>NS4A
 6310 6320 6330 6340 6350 6360 6370 6380 6390 6400
 AGTGGCTGGATGCTGAGATIATTCGACCGACTGCGCTAAAGAAATTAAAGGAAATTTCGAGCTGGAGAGAGCTCTGAGCTGAGCTGAGCTGAG
 R W L D A R I Y S B P L A L K E F K E F A A G R K S L T L N L I T E

 6410 6420 6430 6440 6450 6460 6470 6480 6490 6500
 AAATGGCTAGGGTCCGAGACTTCATGACTGAGCGAGGAGCGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAG
 M G R L P T F M T Q X A R D A U D H L A V I H T S B A G G R A Y N

 6510 6520 6530 6540 6550 6560 6570 6580 6590 6600
 CCATGCTCTGACTGAGCTGCGCGAGCGCTGGAGACGCTGCTTGTACGACATTCCTGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAG
 S A L S E L P E T L S T G E L L T L E A T V T G G I F L Y L M S A

NS4A-75-Ala específicos de D2 PDK-53 (D2 16881 wt. Gly, n=6599)

 6610 6620 6630 6640 6650 6660 6670 6680 6690 6700
 ACCGCGATAGCGAAGATCGCGCTTGGGAGCTGGCTGGAGATACGCGGAGCGAGCTGGAGCTGGAGCTGGAGCTGGAGCTGGAGCTGGAG
 R C I Q K M T L G M C C I T F A S Y I L E W Y A Q I Q P H W I A A S I

 6710 6720 6730 6740 6750 6760 6770 6780 6790 6800
 TAATCTGGAGTTTCTCATGTTGCTTACGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAG
 I D S F L I V L L T F R P X K Q R T F Q D N Q L T X V V I A S L

>NS4B
 6810 6820 6830 6840 6850 6860 6870 6880 6890 6900
 CCGCTGTTGGCGGAGCTGAGATGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAG
 T V V R A T M A R E M G F L E K T K R D L G L G S I A T Q Q F E S

 6910 6920 6930 6940 6950 6960 6970 6980 6990 7000
 AACATGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAG
 R E I L D I D L R P A S A W T E Y A V A T T F V T P M L R H S I E N S

 7010 7020 7030 7040 7050 7060 7070 7080 7090 7100
 CCTGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAG
 S V E V S L T A I A N Q A T V E M G L G R G W F L S R M D I G V P

 7110 7120 7130 7140 7150 7160 7170 7180 7190 7200
 CGTGTCTGGCTTGGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAG
 I L A I S C T Y S Q V R F I T L T A A L S P L L V A R Y A E I G F G L

 7210 7220 7230 7240 7250 7260 7270 7280 7290 7300
 CGAG
 Q A E A T B E A Q X R A A A G I N X N P T V D G I T V I D L C P I F

 7310 7320 7330 7340 7350 7360 7370 7380 7390 7400
 CTTATGATCCGAGCTTGGAGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAG
 Y D P K F E X Q L G Q V M L L V I C V T Q V I L K M R T T W A L C E

Mutación silenciosa adicional (nt 7311 A a G, en semilla maestra y pre-maestra)

ES 2 965 652 T3

7410 7420 7430 7440 7450 7460 7470 7480 7490 7500
 GGGTTTAACTTACCTTAAAGGCGGCAATCCTTCACATTGCGGGGAGGAAATCCGGGAGGGTTTGGAACACTAACATTGGGGGTCTCAATGGGTAACATT
 A L T S A T G P I S T L W E G N P G R F W H T T I A V S M A N I P
 > NSS
 7510 7520 7530 7540 7550 7560 7570 7580 7590 7600
 AGAGCGGTTACTTGGCCGAGGCTGGACTCTCTTTTCAATTGAGACACNACAAACACAGAAAGGGGAACTGGGAAACATACAGAGGGGUTTGAG
 R G S Y D R A G A G L L F S I M K N Y T N T R R G T S N I G E T L G E
 7610 7620 7630 7640 7650 7660 7670 7680 7690 7700
 AGAAATGGAAAAGCCGATGTTAACCGATTTGGGAAAAGTGAAATCCAGAACTACAGAAAGCTGGAAATCCAGGAATGGATAAGACCTTGGCAAAAGG
 K W K S S L N A L G X S E F Q I Y K E S G I Q E V D R T L A K E G
 7710 7720 7730 7740 7750 7760 7770 7780 7790 7800
 CTTAAAGAGGAGGAAACCGGACCCATTCAAGCTGTGTCAGGGGCTCAGCGAAACTGAGGGTCTGGTGAAGAAACATGGGTCACACCGAGAAGGAACTA
 I X R G E T D S K A V S R G S A K & R W Y V E R N N V Y P E G X V
 7810 7820 7830 7840 7850 7860 7870 7880 7890 7900
 CTGGACCCCGCTTGTGGCTACGAGGCGCTGGCTCATCTTGTGGGGACTAAAGATGTTAGAAGTCAAAGGCTAACAAAGGCGGACCGAGACAG
 V D L G C S S G G W S Y Y C G Q L E N V R E V K G L T K G G P G E E
 7910 7920 7930 7940 7950 7960 7970 7980 7990 8000
 AAGAACCCATCCCGATTCACATATGGGAACTTAACTGGCTGTTCAAGTGAGGTTGAGCTTCTTGTGATCCGGGCAAAAGCTGGACACATTAY
 S P I P M S Y Y G W W L V R L Q S G V D V F F I P P E K O D T L I
 8010 8020 8030 8040 8050 8060 8070 8080 8090 8100
 GTGGACACGGGGGACATCACCAAACTCCGCAAGGAGGAAACACTCAGAGCTCTTAACTTGTGAGAAATGGGCTAACACAAACCTCAA
 C D I S E S S F R S T V E A G S Y L R V L N L V S N W S N N N T Q
 8110 8120 8130 8140 8150 8160 8170 8180 8190 8200
 TTTTGCATAAGGTTCTGACCCATATACTCCCTCTAGAAAAATGAGGAACTACAACGAAATATGGGAGGGCTTACGGAGGAACTCCACCTCT
 F C I X V L N P Y S P S V I E R N E A L Q R E K Y G S A L V R W P L S
 8210 8220 8230 8240 8250 8260 8270 8280 8290 8300
 CACGGAACTTCAACATGAGGATGTCTGGGTATGCCATGCTGGCTGGGAAACATAGTCATCTAGTGACCTGACATGTTGATGTTGATCAGAGTTTAC
 R N S T H K M Y H V S N A S G S I V S S V X N M I S R M L I N R F T
 8310 8320 8330 8340 8350 8360 8370 8380 8390 8400
 ATGAGAGTCAAGGAAAGGACTTACGGAGGGGATTTTGAGCTCGGAAKCUAAACGGTAACTCGGGAATGAGGAGGCTAACGGCTAGATATAATP
 M R Y K E A T I E P S V D I G S G Y R N I G I S S E I P N I D I X
 8410 8420 8430 8440 8450 8460 8470 8480 8490 8500
 CGGAAAGAACTAGAAAATAAGGCAAGGAACTCATCTGGGAACTGAAAGGAAACGGGAACTGGGAACTGGGAACTGGGAACTGGGAACTGGGAACTGGGAA
 S E R I E R Y X Q R H E T S W H Y D Q D H P Y R T W A Y H G E Y E T
 8510 8520 8530 8540 8550 8560 8570 8580 8590 8600
 CAAACACGACTGUAATCGACATCGACGGGTTCTGGGAGGG
 R Q E G S A S N V S G V V R L L T K P W D V V P M V T Q M A M T
 8610 8620 8630 8640 8650 8660 8670 8680 8690 8700
 AGACGCGACTCCATTGGACACACGGCGGTTTTTAAAGGAAAGGAAACCGGAGGAAACCGGAGGAAACCGGAGGAAACGCGAGGAAACTTAACTGAA
 D T T P F G Q R R V F K R K V D T R T Q S P K E G T R K L N X I T
 8710 8720 8730 8740 8750 8760 8770 8780 8790 8800
 GGAGAGTGGCTTGGAGAAATTTAGGGGAGAAAGGACACGGGAGGGTGG
 A E W L W K E L G K X K T P R M C T R E E F T R X V R S N E A L G A
 8810 8820 8830 8840 8850 8860 8870 8880 8890 8900
 CCATTTGGATGAGGAACTGAGGAAAGGAACTGGGAGGG
 I P T D S W X W X S A R R A V E D S R F W S L V D K E R N L N L S
 8910 8920 8930 8940 8950 8960 8970 8980 8990 9000
 ACCGAACTCTGAAACATCTGTGACACATGATGGGAAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
 G E C E T C V Y N M N G K R E E K L G E F G E A K G S R A I W Y M
 9010 9020 9030 9040 9050 9060 9070 9080 9090 9100
 TGCGTTGGAGGAGGGCTTCTGGAGGAGGG
 W L G A R F L E F R A L G F L N E D H W F S R E S L S G V E G E G
 9110 9120 9130 9140 9150 9160 9170 9180 9190 9200
 GGGTGCACAGGCTGGGGTCACTTCAAGGACGCTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
 I N E L G Y I W R D V S K K E G G A M Y S D D T R G W D V R I X I
 9210 9220 9230 9240 9250 9260 9270 9280 9290 9300
 AGGAGCGCTAAAGGAAAGGAAATGGTAAACGAAACGACATGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
 E S L K N E R S V T N H M E G E S K K L A E A I F K L Y Q N K V

ES 2 965 652 T3

Semilla de virus maestra (MVS) de DENvax-2

- 5 En el presente documento se proporcionan la secuencia de nucleótidos del genoma de virus recombinante
(SEQ ID NO: 14 en la lista de secuencias) y la secuencia de aminoácidos deducida de la proteína traducida
(SEQ ID NO: 6 en la lista de secuencias). El virus modificado mediante ingeniería genética tiene como base el
virus D2 PDK-53. Se marcaron todas las sustituciones modificadas mediante ingeniería genética que son
diferentes del virus DEN-2 16681 de tipo salvaje (también el virus progenitor para PDK-53), así como las
10 mutaciones extra (cambios del clón de ADNc modificado mediante ingeniería genética) detectadas en MVS.

Sustituciones incluidas en el genoma y la proteína:

La cadena principal del virus D2 PDK-53 (cambio de D2 16681 wt): todo en negrita

- 15 a. Región 5'-no codificante (NCR)-57 (nt-57 C-a-T): locus principal de atenuación (en color rojo)

b. prM-29 Asp-a-Val (nt-524 A-a-T)

20 c. nt-2055 C-a-T (gen E) mutación silenciosa

d. NS1-53 Gly-a-Asp (nt-2579 G-a-A): locus principal de atenuación (en color rojo)

e. NS2A-181 Ieu-a-Phe (nt-4018 C-a-T)

f. NS3-250 Glu-a-Val (nt-5270 A-a-T): locus principal de atenuación (en color rojo)

5 g. nt-5547 (gen NS3) mutación silenciosa T-a-C.

h. NS4A-75 Gly-a-Ala (nt-6599 G-a-C)

* La mutación silenciosa nt-8571 C-a-T de PDK-53 no se modifica mediante ingeniería genética en el virus de vacuna.

10 10 Marcador de clon modificado mediante ingeniería genética (mutación silenciosa):

a. Mutación silenciosa nt-900 T-a-C: marcador de clon infeccioso.

15 15 Sustituciones adicionales encontradas en la semilla de vacuna (0,02% nt diferente del clon original)

a. prM-52 Lys-a-Glu (nt-592 A-a-G), en negrita.

b. NS5-412 Ile-a-Val (nt-8803 A-a-G), en negrita.

20

ES 2 965 652 T3

ES 2 965 652 T3

2050 2060 2070 2080 2090 2100 2110 2120 2130 2140 2150 2160

Mutación silenciosa nt 2855-T de D2 PDK-51 (D2 16881; C)

二三八

Locus de atenuación D2 PDK-53 NS1-53-Asp (peso D2 16681; Gly, nt-2579-G)

2650 2655 2660 2665 2670 2675 2680 2685 2690 2695 2700 2705 2710 2715 2720 2725 2730 2735 2740 2745 2750 2755 2760

2930 2932 2934 2936 2938 2940 2942 2944 2946 2948 2950 2952 2954 2956 2958 2960 2962

3010 3020 3030 3040 3050 3060 3070 3080 3090 3100 3110 3120

3130 3140 3150 3160 3170 3180 3190 3200 3210 3220 3230 3240

3289 3288 3278 3286 3290 3300 3318 3326 3330 3342 3356 3362

8370 8384 8389 8390 8391 8392 8393 8394 8395 8396 8397 8398 8399 8400 8401 8402 8403 8404 8405 8406 8407 8408 8409 8410 8411 8412

R S C T L P A R Y R O S D G C W K G N E I R P L N E S S S L V N S X V T A S

REQUOTATION REQUESTED FROM ALL VANSFY

TYLTGKNSFEDLGRVYVNGATIMDTRIGMGTYTLAKRAT

2002 2003 2004 2005 2006 2007 2008 2009 2010 2011

MS14-381 Rho-specific de DS RDX 53 (no 3818) et Leu (n° 3818 C)

15-2001-001

4339 4348 4350 4356 4370 4382 4390 4400 4410 4420 4430 4440

4883 4888 4890 4889 4888 4888 4890 4888 4888 4888 4888 4888 4888

ES 2 965 652 T3

Locus de atenuación de NS3-258-Val de E2 PDK-53 (E2 16881: Glu, nt 5278-A)

Mutación silenciosa nt-5547-C de B2 PDK-53 (D2 1888T; T)

NS4A-F5-Ala específica de D2 PDK-53 (D2 1618) wt Gly, nt 4599

ES 2 965 652 T3

ES 2 965 652 T3

Semilla de virus maestra (MVS) de DENvax-3

- 5 En el presente documento se proporcionan la secuencia de nucleótidos del genoma de virus quimérico (SEQ ID NO: 15 en la lista de secuencias) y la secuencia de aminoácidos deducida de la proteína traducida (SEQ ID NO: 9 en la lista de secuencias). La mayor parte del gen prME (nt-457 a -2373 subrayado) es específico del virus DEN-3 16562 de tipo salvaje (wt); el resto de la secuencia de nucleótidos es específica del virus DEN-2 PDK-53. La proteína E del virus DEN-3 tiene dos aminoácidos menos que la proteína E de DEN-2. Por lo tanto, la posición del nt que empieza a partir de NgoMIV es 6 nt menos que la posición del nt de DEN-2 PDK-53 original. Se marcaron todas las sustituciones modificadas mediante ingeniería genética que son diferentes del virus wt (DEN-3 16562 o DEN-2 16681), así como las mutaciones extra (cambios del clon de ADNC modificado mediante ingeniería genética).

10

15 Sustituciones incluidas en el genoma y la proteína:

Sitios de unión

20 a. Mlul (nt 451-456): mutación silenciosa modificada mediante ingeniería genética, nt-453 A-a-G

b. NgoMIV (nt 2374-2379): mutaciones modificadas mediante ingeniería genética, nt-2375/2376 TG-a-CC (dio como resultado un cambio E-480 Val-a-Ala)

Cadena principal del virus D2 PDK-53 (cambio de D2 16681 wt): en negrita

25 a. región 5'-no codificante (NCR)-57 (nt-57 C-a-T): locus principal de atenuación (en color rojo).

b. NS1-53 Gly-a-Asp (nt-2573 G-a-A): locus principal de atenuación (en color rojo).

30 c. NS2A-181 Leu-a-Phe (nt-4012 C-a-T)

d. NS3-250 Glu-a-Val (nt-5264 A-a-T): locus principal de atenuación (en color rojo).

e. nt-5541 (gen NS3) mutación silenciosa T-a-C.

35 f. NS4A-75 Gly-a-Ala (nt-6593 G-a-C)

* mutación silenciosa nt-8565 C-a-T de PDK-53 no modificada mediante ingeniería genética en el virus de vacuna.

40 Mutación modificada mediante ingeniería genética en DEN-3 prM-E (cambio de D3 16562 wt)

a. Mutación silenciosa modificada mediante ingeniería genética nt-552 C-a-T: marcador de clon

45 b. E-345 His-a-Leu modificada mediante ingeniería genética (nt-1970 A-a-T) para una replicación eficaz en cultivos.

ES 2 965 652 T3

Sustituciones adicionales encontradas en semillas de vacuna (0,02% nt diferentes del clon original)

- a. Mutación E-223 Thr-a-Ser (nt-1603 A-a-T, en negrita)
5 b. Mutación silenciosa nt-7620 A-a-G (en negrita)

> Región 5'-No Codificante NCR-57-T, locus de atenuación de D2 PDK-61 (D2 4868) wt: C>C
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
ACGTGTTTACTCTTACCGAACGGACAAAGGACAGATTCTTCAGGGACCTTAAGCTGAAAGTAGCTCTAACACTTTTTAAATTAGACGAGAGATCTTGATGAA
X X
110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
ATAAACCCGGAAAAGCGGGAAGAACGGCGCTTCAATTCGCTGAAACGGGAGAGAAACGGGCTGGCAACGAGCTGCAAAAGGAGATTCTGAA
X Q R K X & N N T S F N M L X R E R N R V S T V Q Q L T N R F S L

ES 2 965 652 T3

ES 2 965 652 T3

1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000
 TGGATTCAAACGGGAAATGCAACCGAAGCTTCTCCGACGAAATGCAACGAAAGCTTGATGCAAGCTGACGCCACGAACTG
 S Y R G S D A P C R I F P S T E D Q G K R A N H G R I T T S X F V
 |
 His 5 Leu de E345-modificado genéticamente (B3 16582 wt: nt 1978-A) para crecimiento eficaz

2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080 2090 2100
 GGTGACGAAAGGCGCCTGTCACATTGAGCTGACCTGTTTGCAAGAACTGAACTGATTAATGCAACGAAAGCTTGATGCA
 V T K K D E P V N I K A E F P F G E S N I V I G I G D K A L X X X
 |
 2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170 2180 2190 2200
 TGTGTCAGAAAGGCGCCTGTCACATTGAGCTGACCTGTTTGCAAGAACTGAACTGATTAATGCAACGAAAGCTTGATGCA
 W Y E K G S S I G E M F R T A R G A R R M A I L G D T & W D F G S
 |
 2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280 2290 2300
 GAGTGGTGGCTGTTGATGATGTTGAGGAAATGCAACGAAAGCTTGATGCAACGAAAGCTTGATGCAACGAAAGCTTGATGCA
 V S G V L N S L G K M V H Q I F G S A Y T A R F G S V S W M M K I
 |
 Fin de la secuencia de B3 16582

2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 | 2380 2390 2400
 TGGATAAGCTGCTGTTGATGATGTTGAGGAAATGCAACGAAAGCTTGATGCAACGAAAGCTTGATGCAACGAAAGCTTGATGCA
 S T G V L L T W I G L N S K N T S M S Y S C T A A G I V T L Y L G
 |
 Sitio de empalme NgnmIV modificado genéticamente, Val 5 Ala de E-486 (nt 2375/2376 TG a CC)

> NS1
 2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480 2490 2500
 GTCATGGCCAGGCCGATTTGCTTGTGACCTGAAARACAAAGAAACTGAAATGCGACTGCGGATTTTCATCACAGAACGTCACACATGCA
 V M V Q A D S S C V V S W K K E L X C G S G I F I T D W V R T W T
 |
 2510 2520 2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590 2600
 CACACAGATACAAGTTGACCCGAAATCCGAAACGTTGAAACGCTATCGGAAGCCCATGAAAGGGAGCTTGGGAGTCCCGGAGCTAACGAA
 S Q T K P Q P S S P S K L A S A I Q K A H E S D I C G I R S Y T R
 |
 Locus de atenuación NS1-53-Asp de B2 PDK-53 (B2 16681 wt: Gly, nt 2573-G)

2610 2620 2630 2640 2650 2660 2670 2680 2690 2700
 ACTTGAGATCTGTATTTGAAACRAATRACCCGAAATTTATTCATTCATGAAATGAGCTGTTTAACTTATGACAGCAAGCATCAAGCA
 L E N L M W R Q I T P E L N H I L S E N E V K L T I M T G D I K G
 |
 2710 2720 2730 2740 2750 2760 2770 2780 2790 2800
 ATCATGCAGCCGAAANACGATCTGCTGCGGCTGACCGCTGAGCTGATTCATGAAACCATGCGCAAAAGCAAAATGCTCTTACAGACTTC
 I M Q A G K R S L R F Q P T E L K Y S W K T W G R A K M L S Y E S B
 |
 2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870 2880 2890 2900
 ATAACCGAGACCTTTCATATGATGGCCCGAACAGGAAATGCCAACACAAATGAGCTTGGATTCCTGGGATTTGAAAGACTATGGCTTGAGT
 N Q T F L I D G P E T A S C F N T N R A W N S L E V S D Y G F G V
 |
 2910 2920 2930 2940 2950 2960 2970 2980 2990 3000
 ATTCGCGGAAATATGCTGAAATTCGAGAAACGGATGATGATTCGCGACTCAAAACTCTTCGCGGCGATCAAAGACAGCGCTTCAC
 F T T W I J W S R L X R E K Q D V F C D S R L K S A A I K D R R A V R
 |
 3010 3020 3030 3040 3050 3060 3070 3080 3090 3100
 CGCGATATGGCTTATTCGATAGCAAACTGCAATGCGACGAGCTGAAAGCTGCTTCATGAAACTTAACTGAACTGGCGAAACAAATCAG
 A D M S X W I E S A L N G T W K I E N A S F I E V K N C H W F E S B
 |
 3110 3120 3130 3140 3150 3160 3170 3180 3190 3200
 ACACCGCTGCGGCGATGCGAGCTGCTGAAAGCTGAGCTGAAAGCTGCGGAGCTGCTTCATGAAACGAACTGAACTGGCGGGTACCTGAC
 T L W S N G V L E S E N I I P K R N L A G P V S Q H R Y S P G Y N T
 |
 3210 3220 3230 3240 3250 3260 3270 3280 3290 3300
 AGCATGAGGCGGCGATGATGAGCTGAGCTGAGCTGCTGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTG
 Q I F G S W H I G X L E M D F D P C D G T T V Y V T E D C G N R S
 |
 3310 3320 3330 3340 3350 3360 3370 3380 3390 3400
 CGCTTGGAGACGAGCTGCTGCTGAAAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTG
 P S L R T T T A S G K L I T E W C C R S C T L P R Y R G E D G C
 |
 > NS2A
 3410 3420 3430 3440 3450 3460 3470 3480 3490 3500
 GCTGGTACGGGATGAAATTCAGGCGATTCAGGAACTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTG
 W Y S M S I R P D N K R E N D V N S L V T R G H G Q V D N F S L
 |
 3510 3520 3530 3540 3550 3560 3570 3580 3590 3600
 AGGAGCTGGAAATGCGATGCTGCGGAAATGCGGAAATGCGGAAATGCGGAAATGCGGAAATGCGGAAATGCGGAAATGCGGAAATGCGGAAATGCG
 G V L G M A L F L E E M L R T R V G T K H A I L L V A V S F V T L

ES 2 965 652 T3

3610 3620 3630 3640 3650 3660 3670 3680 3690 3700
 ATCACAGGAACTATCCTTAAKGAACCTGGAAAGACTGATGTTAATGCTAGCCACATGACGGATGCAATGCTATGGGCTTGACUTACGCC
 I T G N M S F R D L G S V M V N V G A T M T D D I S G M G V T Y L A L

 3710 3720 3730 3740 3750 3760 3770 3780 3790 3800
 TACTACAGGAACTCAAGTCAGACCAACTTTCAGGCTGGACTCTGTGAGAAACGCTCCAGGAAATTGTGATGACTCTATAGGAAATTCT
 E A A Y K V R P T F A A G L L E R K L T S E L M H T I G I V L

 3810 3820 3830 3840 3850 3860 3870 3880 3890 3900
 CCCTTCGGAGGACCACTAACCGAGACCAATTCTGAGTGTGACTGATGCTTGGGATGAGGAACTGATGCTTCAAACTGGTCAAGAAATAT
 L S Q S T I P E T I L E L T D A L A L G M N V L K M V R N M E K Y

 3910 3920 3930 3940 3950 3960 3970 3980 3990 4000
 CAATGGGCTGCTATCAAGCTATCTGCGCTCCAAACCCGCTTATTAACAAACCCATGGGAAATTGAGGTCACAAATATGGGCTGGCTCC
 Q L A V T I M A T L C V P N A V I L Q N A N K V S C T I L A V V S V

 4010 4020 4030 4040 4050 4060 4070 4080 4090 4100
 TTCCCCCACCTTCCTAACATCTACACCAAAACAGCTGGGATACCTTACGGATCAAGGTCTCAATCCASCGCTTCTAACAC
 S P L F L T S S Q Q K T D W I P L A L T I R G L S P T A I P L T P

NS2A-181-Phe específica de D2 PDK-53 ID2 18681 wt: leu, nt 4012-C)

> NS2B

4110 4120 4130 4140 4150 4160 4170 4180 4190 4200
 CCCTCAADACCCAGGAAAGGACGCTGGGAACTTAAATGACCTTAACTGGGATGAGGCTGGGATGCTGGGATGGGCTGGGAAATGAT
 L S R T S X K R S W P L N E A I M A V G M V S I L A S S L L K N D

 4210 4220 4230 4240 4250 4260 4270 4280 4290 4300
 ATTGCCATGACGGAACTTAACTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCT
 I P M T G F L V A S G D L T V C Y V L T G R S A D L E L E R A A D V

 4310 4320 4330 4340 4350 4360 4370 4380 4390 4400
 TCAAAATGGAAACGACCAAGGAGAACTTACGGGATGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGG
 K N B S Q A E I S G S B P I L S I T I S D E U G S M S I X N B E E S

 4410 4420 4430 4440 4450 4460 4470 4480 4490 4500
 ACRAAACACTGCACTCTTAACTGAGGATCTTGTGATGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGG
 Q T L T I L I R T G L L V I S G D F P V S I P I T A A R W Y L W E

> NS3

4510 4520 4530 4540 4550 4560 4570 4580 4590 4600
 CTGAAAGAAACGG
 V K E Q R A G V L W D V F S P P M G K A E L E D G A Y R I K Q R G

 4610 4620 4630 4640 4650 4660 4670 4680 4690 4700
 GGATTCTGGCATATTCCCGAGATCGGG
 I L G Y S Q I G A R V Y K E G T F M I N W H V T R G A V L M R K G

 4710 4720 4730 4740 4750 4760 4770 4780 4790 4800
 AAAGGAGGATGACCCATATGACCGGACCTCTGAGAACGCTTAAATCATATGAGGAGGAGCTGAGGAGGAGCTGAGGAGGAGGAGGAG
 K R I E P S W A D V K E D L I S Y G S G W K L E G E W K E S E V

 4810 4820 4830 4840 4850 4860 4870 4880 4890 4900
 CAGGTTATGCACTGG
 Q V L A L E P G K N F R A V Q T R K F G L F E T N A G T I G A V S E D

 4910 4920 4930 4940 4950 4960 4970 4980 4990 5000
 ACTTTTCTGGGAGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGG
 P S F G T S G S P I I D K K Q K V V G K Y G N G V Y V T R S G A Y V

 5010 5020 5030 5040 5050 5060 5070 5080 5090 5100
 GAGTGTATGCGGG
 S A I A Q T E K S I E D N F E I E D O I F R X R X L T I M U L R F

 5110 5120 5130 5140 5150 5160 5170 5180 5190 5200
 CGAGGGGGGAGGACCAAGGAGATAACCTTGGGGGAGATGAGGAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
 G A G X T R B Y L P A I V N E A I E R G L S T L I L A P T R B V V S A

 5210 5220 5230 5240 5250 5260 5270 5280 5290 5300
 CTGAAATGGGAGGAGGGCTTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGG
 R M K N A S R G L F I R Y Q T F S I R A V B T G R S I V D L M C R

Locus de atenuación NS3-Val de D2 PDK-53 (D2 18681: Glu, nt 5278-A)

5310 5320 5330 5340 5350 5360 5370 5380 5390 5400
 TGGGACATTTCCTGAGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGG
 TGGGACATTTCCTGAGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGG

ES 2 965 652 T3

Mutación silenciosa nt-5641-C de D2 PDK-53 (D2 ~ 16681; T)

5610	5620	5630	5640	5650	5660	5670	5680	5690	5700
TCCAACTTAAAGCAGGAAATGATATACAGGTTCTCGGAAAATGCAARCA>TCATACTACACTACGCCAACCTTGATCTGACTATGTC	P	S	I	K	A	G	N	D	I
F	S	I	K	A	G	N	D	I	R
5710	5720	5730	5740	5750	5760	5770	5780	5790	5800
AGGACTGAAKIAATGATTGGGACTTGTGTTACATCTG>CTTTCAGAAATGTTGTTGAACTGTTATGCGGAAACGTTTATGACCCGAGGCTGCA	K	T	R	T	S	D	W	D	F
M	V	V	T	T	D	I	B	E	M
C	A	N	F	X	S	E	R	V	I
G	M	C	R	V	D	P	R	R	C
5810	5820	5830	5840	5850	5860	5870	5880	5890	5900
TGAAACGCTCATCTAACAGATGCTGAGACGGGCTGTTCTGGAGAACCTATGCGCTGCGGAACTGAGAAGACAGAGATAGG	K	P	V	I	L	T	D	G	S
C	E	R	V	I	L	A	G	P	N
G	T	H	S	S	A	A	Q	R	S
B	I	G	S	R	G	B	I	G	
5910	5920	5930	5940	5950	5960	5970	5980	5990	6000
ARGAAATCCAAAATGAAATGAGATGACCTGTCATATACATGGGAAACCTCTGGAATAATGATGAGACTGTCACACTGCAAGAACGTTAAATGCTCTA	R	S	F	K	N	R	D	Q	Y
R	N	D	Q	Y	I	Y	S	G	E
K	M	L	N	P	L	B	N	D	O
E	A	H	W	K	E	A	K	M	L
6010	6020	6030	6040	6050	6060	6070	6080	6090	6100
GATGATCTGAAACGCCGCGAGGAAATGATCTTGTAGCTGTTGAAACCGACCTGAAADGTCGATCTGCTTGTGCAATGAACTGCGGAGAG	P	N	I	N	T	P	S	G	T
T	E	S	G	I	T	F	S	M	F
E	R	E	F	R	E	K	V	D	A
S	T	R	L	R	G	S	T	R	A
6110	6120	6130	6140	6150	6160	6170	6180	6190	6200
CAAGGAAACCTTGTGAGCTTAATGAGAAAGAGAGACTTACAGCTGTTGCGCTAACAGCTGCGCTAACAGCTGCGCTAACAGCTGCGCTAACAGCTG	R	K	T	P	V	D	L	M	R
R	G	D	L	P	V	W	L	A	Y
G	I	N	T	A	D	R	S	W	
6210	6220	6230	6240	6250	6260	6270	6280	6290	6300
GTGTTTTGATGAGTCAGAAACGAAATCTTGAAGAAACGAAATCTGAAAGTGTAAATCTGAAACAAAGAACGAAAGAACGAAATGAAACGCCGAGAG	C	F	D	G	V	X	S	N	Q
G	T	I	L	E	N	V	E	V	R
T	K	E	S	T	K	E	S	T	K
K	L	K	P	R	N				

3 N543

6310	6320	6330	6340	6350	6360	6370	6380	6390	6400																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
F T C G A T T C T A S C A T C T T C A C C U A C T C G C G T A A R C A A T T R A S S A A T T T C A G G U C G & A C A A & T T C A G C C U C S A C C T A T C S C A G A A T C S	S	S	A	B	I	Y	S	D	P	L	A	L	K	E	F	K	E	F	A	A	G	R	R	S	L	T	N	L	I	T	E	M	C																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
6410	6420	6430	6440	6450	6460	6470	6480	6490	6500	6510	6520	6530	6540	6550	6560	6570	6580	6590	6600	6610	6620	6630	6640	6650	6660	6670	6680	6690	6700	6710	6720	6730	6740	6750	6760	6770	6780	6790	6800	6810	6820	6830	6840	6850	6860	6870	6880	6890	6900	6910	6920	6930	6940	6950	6960	6970	6980	6990	7000	7010	7020	7030	7040	7050	7060	7070	7080	7090	7100	7110	7120	7130	7140	7150	7160	7170	7180	7190	7200	7210	7220	7230	7240	7250	7260	7270	7280	7290	7300	7310	7320	7330	7340	7350	7360	7370	7380	7390	7400	7410	7420	7430	7440	7450	7460	7470	7480	7490	7500	7510	7520	7530	7540	7550	7560	7570	7580	7590	7600	7610	7620	7630	7640	7650	7660	7670	7680	7690	7700	7710	7720	7730	7740	7750	7760	7770	7780	7790	7800	7810	7820	7830	7840	7850	7860	7870	7880	7890	7900	7910	7920	7930	7940	7950	7960	7970	7980	7990	8000	8010	8020	8030	8040	8050	8060	8070	8080	8090	8100	8110	8120	8130	8140	8150	8160	8170	8180	8190	8200	8210	8220	8230	8240	8250	8260	8270	8280	8290	8300	8310	8320	8330	8340	8350	8360	8370	8380	8390	8400	8410	8420	8430	8440	8450	8460	8470	8480	8490	8500	8510	8520	8530	8540	8550	8560	8570	8580	8590	8600	8610	8620	8630	8640	8650	8660	8670	8680	8690	8700	8710	8720	8730	8740	8750	8760	8770	8780	8790	8800	8810	8820	8830	8840	8850	8860	8870	8880	8890	8900	8910	8920	8930	8940	8950	8960	8970	8980	8990	9000	9010	9020	9030	9040	9050	9060	9070	9080	9090	9100	9110	9120	9130	9140	9150	9160	9170	9180	9190	9200	9210	9220	9230	9240	9250	9260	9270	9280	9290	9300	9310	9320	9330	9340	9350	9360	9370	9380	9390	9400	9410	9420	9430	9440	9450	9460	9470	9480	9490	9500	9510	9520	9530	9540	9550	9560	9570	9580	9590	9600	9610	9620	9630	9640	9650	9660	9670	9680	9690	9700	9710	9720	9730	9740	9750	9760	9770	9780	9790	9800	9810	9820	9830	9840	9850	9860	9870	9880	9890	9900	9910	9920	9930	9940	9950	9960	9970	9980	9990	9999

NS4-75-Ala específica de D2 PDK-53 (D2 18821 wt. Gly, nt-6389-G)

6610 6620 6630 6640 6650 6660 6670 6680 6690 6700
 RTAGGGGAGATGCCCTGGAAATGTCGCTCCATATACTCACCGCTTRCCATCTCCCTATGGACACAAATAAGCCRCRCACTGTATGGCAGCTTCAATAATAC
 I G M T L G N C C I I T A S I L L W Y A Q I Q F M N I R A S I I L
 6710 6720 6730 6740 6750 6760 6770 6780 6790 6800
 TGGAGCTTTTCTCATAGTTTCTTAACTCCAGGACCCAAAACAGGAAACAGCCCAGACGACCCACTGACCTTGTTGTCATGCCATCCATCAACGCT
 E F F L I V L L I P S P R X Q R T F Q D H Q L T Y V V I A I & T V
 > NS48
 6810 6820 6830 6840 6850 6860 6870 6880 6890 6900
 GCTGGCGGCAACGCTGGCAAACGGAGATGCTTGCCTAAGAAAACUGAAAAGATCTGGTGTGGCAAGGCTGGCAACCCGSCAACCGGAGAACATC
 V A T H A N E M G F K E X T K X D L G L G B I A T Q Q P X B N I
 6910 6920 6930 6940 6950 6960 6970 6980 6990 7000
 CTGGACATAGATOTACGTCCTGCATCGATGGACGCGTGTATGCGGACACAAATTGTTAACCCATGTTAGACATAGCATGGAAATTCTGAG
 L D I D L R P A S A N T L Y A V A T T F V T P M D R H S I E N S S V
 7010 7020 7030 7040 7050 7060 7070 7080 7090 7100
 TGAATGTTGCTTAQAGCTTAAAGCCACCGCAGCGCTGTAAATGGCTGGAAAGGATGGCCATTGTCTGAGATGGACAGCTGGAGCTTCCCTTCT
 N V S L T A I A N Q A T V L M G I L G X G W F L S K M D I Q V P L L
 7110 7120 7130 7140 7150 7160 7170 7180 7190 7200
 CGCATGGGCTTCGCAACTGAAACGAAATGCTCACGSCAGCTTGGCTGATGGCAAGCTGGCCATTGTCTGAGATGGACAGCTGGAGCTTCCCTTCT

ES 2 965 652 T3

ES 2 965 652 T3

Semilla de virus maestra (MVS) de DENVAx-4

- 5 Secuencia de nucleótidos del genoma de virus químérico (SEQ ID NO: 16 en la lista de secuencias) y secuencia de aminoácidos deducida de la proteína traducida (SEQ ID NO: 12 en la lista de secuencias). La mayor parte del gen prM-E (nt-457 a -2379 subrayado) es específico del virus DEN-4 1036 de tipo salvaje (wt); el resto de la secuencia de nucleótidos es específica del virus DEN-2PDK-53. Se marcaron todas las sustituciones modificadas mediante ingeniería genética que diferían del virus wt (DEN-3 16562 o DEN-2 16681) así como 10 las mutaciones extra (cambios del clón de ADNc modificado mediante ingeniería genética).

Sustituciones incluidas en el genoma y la proteína:

Sitios de unión:

a. MIUL (nt 451-456): mutación silenciosa modificada mediante ingeniería genética, nt-453 A-a-G

5 b. NgoMIV (nt 2380-2385): mutaciones modificadas mediante ingeniería genética, nt-2381/2382 TG-a-CC (dieron como resultado un cambio en E-482 Val-a-Ala)

Cadena principal del virus D2 PDK-53 (cambio de D2 16681 wt)

10 a. Región 5'no codificante (NCR)-57 (nt-57 C-a-T): Locus principal de atenuación (en color rojo).

b. NS1-53 Gly-a-Asp (nt-2579 G-a-A): Locus principal de atenuación (en color rojo).

c. NS2A-181 Leu-a-Phe (nt-4018 C-a-T, en negrita)

15 d. NS3-250 Glu-a-Val (nt-5270 A-a-T): Locus principal de atenuación (en color rojo).

e. nt-5547 (gen NS3) mutación silenciosa T-a-C (en negrita).

20 f. NS4A-75 Gly-a-Ala (nt-6599 G-a-C, en negrita)

* mutación silenciosa nt-8571 C-a-T de PDK-53 no está modificada mediante ingeniería genética en el virus de vacuna

25 Sustituciones modificadas mediante ingeniería genética en el clon de ADNc

a. C-100 Arg-a-Ser modificada mediante ingeniería genética (nt-396 A-a-C): puede mejorar la replicación viral en el cultivo

30 b. Mutación silenciosa nt-1401 A-a-G modificada mediante ingeniería genética.

c. E-364 Ala-a-Val modificada mediante ingeniería genética (nt-2027 C-a-T): puede mejorar la replicación viral en cultivo

35 d. E-447 Met-a-Leu modificada mediante ingeniería genética (nt-2275 A-a-C): puede mejorar la replicación viral en cultivo.

Sustituciones adicionales encontradas en la semilla de vacuna (0,06% nt diferentes del clon original).

40 a. Mutación silenciosa nt-225 (gen C) A-a-T (en negrita)

b. Mutación NS2A-66 Asp-a-Gly (nt-3674 A-a-G) (en negrita)

c. NS2A-99 Lys-a-mixto Lys/Arg (nt-3773 A-a-mixto A/G, en negrita)

45 d. Mutación silenciosa nt-5391 C-a-T (gen NS3) (en negrita)

e. NS4A-21 Ala-a-Val (nt-6437 C-a-T, en negrita)

50 f. Mutación silenciosa nt-7026 T-a-miixto C/T (en negrita)

g. Mutación silenciosa nt-9750 A-a-C (en negrita)

ES 2 965 652 T3

ES 2 965 652 T3

810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
 GAGACTGAGGCTGCGATTCGAAACGAGATTCCGGCTCTTGGCGGATTTAGGTTTATGATTCGGGCAGAACGATTTACGCGAAGCTGTC
 R V E S N K I L R N F G S A M L L A G S M A Y H I G S Q T I Q O R N E V P

910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000
 TTTTGTATTAATGCTGGCGUUCGACCTAAGGAATCCGGTCGCTTACGACTTGACGAAAGAACGTTTGAGAGGAGCTCAGTGCGACATGCGT
 F V L N M Y A S E S Y G R C V Y G V N K R P F E V E G V S G S G A N V D

1130 1120 1110 1100 1090 1080 1070 1060 1050 1040 1030 1020 1010 1000 990 980 970 960 950 940 930 920 910 900 890 880 870 860 850 840 830 820 810 800 790 780 770 760 750 740 730 720 710 700 690 680 670 660 650 640 630 620 610 600 590 580 570 560 550 540 530 520 510 500 490 480 470 460 450 440 430 420 410 400 390 380 370 360 350 340 330 320 310 300 290 280 270 260 250 240 230 220 210 200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300
 GCACTAATTCGCGAGATTTGGTACAGCAGCTTCCATTCGTTGCTTGAAACGAGACTTGACAGTGTCAAGTTCTGG

1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
CGGGGAGCTTACGCCATTTCTCCATTGTTACCTTGATACGAGGTTGTGAGCTTCACATGGGAAACCGGATCAGTGGAAATGCGC

1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500
 GTCGCAATCTTCCGAACTTACAGCCTACCGATACGCTTCCAGGAACTACCATCGCTTCAACTCTAAATGGCCGACACTATGACAGCTAACACTTGATGTGAAACCAGG

Mutación A a G nt 1493 silenciosa en cDNA modificado genéticamente

1510	1520	1530	1540	1550	1560	1570	1580	1590	1600	
TCTGGATTTGACTTT>AGTGTGATTGCTGTCTGAAATTAATAAAGCATGCTTCCATGAACTGTTGGAATCTACCTTACCGTGGAACAG	S	T	R	K	M	N	K	E	V	S

1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700
 CAGGAACTTACACATCAGGGTCACGGGAACTACAAAGAGATGCGACATTGAGCTTCAGGCCAGAGCAAGCTTGACAGCTTGGSATC

1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900
ATGGAGGAATTCTTGGAACTGCGGAGGTCAATTCAGAATGGCTTCCAGAATTTCTTCAATTCACGGAACTGCGGACAGCAGGAACTGGGACACAGCTTGC

1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000
 TGAATGTCAGAATGAACTGGCTTCCGTTGAAATTGCGCTATGAACTGAACTGCTATCCTGAACTGAC

2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080 2090 2100
 CCCTTGTGCGCTGAGATACCCAACTGTCACGCCACCATAGGGTTAGAACCCCCCTTGCGACAGCTCACATACTGATAGCTGTTGCAACACTCATTGACA

Ala a Val E-364 modificada genéticamente (nt 2827 C a T) para mejorar el crecimiento viral en cultivo

2210 2211 2212 2213 2214 2215 2216 2217 2218 2219 2220 2221 2222 2223 2224 2225
 CTCCTATGGTTCAGGAAAGGAGTTCCCTTGCGAAGATTTTGACTGCCATACCGAGGNSCRAAACGAAATGCCCTTCTBGGTGTAAACASCTTGGGTT
 L H W F R E G S S I S E M F E S T Y R G A K R N A I L L G E T A W D E

Mutación Met 1 Leu E-417 modificada genéticamente (nt-2275 A > G)

ES 2 965 652 T3

Fin de la secuencia de D4 1036

2310	2320	2330	2340	2350	2360	2370	I	2380	2400					
T	A	G	A	T	C	T		A	G	I	V	T	L	Y

Síntesis de empaile NgeffIV modificado genéticamente, E-482 Val a Ala (nt 2381/2382 TG a CC)

2410	2420	2430	2440	2450	2460	2470	2480	2490	2500					
T	T	C	A	T	C	A	T	C	A	T	C	A	C	A
L	G	V	M	V	Q	&	D	S	G	C	V	V	S	R
K	K	K	K	K	K	E	L	K	C	G	S	I	P	I
W	T	R	Q	Y	R	F	Q	P	E	S	F	S	K	L
A	S	A	T	Q	N	K	H	R	S	D	T	C	E	S
S	A	T	Q	N	K	H	R	S	D	T	C	E	T	S

Locus de atenuación NS1-53-Asp de D2 PDK-53 (D2 16681 wt: Gly, nt 2579-G)

2610	2620	2630	2640	2650	2660	2670	2680	2690	2700					
A	A	C	A	G	A	T	T	A	T	T	A	T	T	C
T	B	G	S	N	L	X	X	Q	I	T	F	S	L	X
X	R	E	K	S	R	X	X	Q	I	T	S	E	X	R
Y	T	R	Q	I	T	F	S	L	X	I	L	S	E	V
Z	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	P	T
S	G	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	T
W	T	R	Q	I	T	F	S	L	X	I	L	S	E	V
X	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	P	T
Y	T	R	Q	I	T	F	S	L	X	I	L	S	E	V
Z	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	P	T
S	G	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	T
W	T	R	Q	I	T	F	S	L	X	I	L	S	E	V
X	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	P	T
Y	T	R	Q	I	T	F	S	L	X	I	L	S	E	V
Z	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	P	T
S	G	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	T
W	T	R	Q	I	T	F	S	L	X	I	L	S	E	V
X	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	P	T
Y	T	R	Q	I	T	F	S	L	X	I	L	S	E	V
Z	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	P	T
S	G	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	T
W	T	R	Q	I	T	F	S	L	X	I	L	S	E	V
X	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	P	T
Y	T	R	Q	I	T	F	S	L	X	I	L	S	E	V
Z	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	P	T
S	G	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	T
W	T	R	Q	I	T	F	S	L	X	I	L	S	E	V
X	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	P	T
Y	T	R	Q	I	T	F	S	L	X	I	L	S	E	V
Z	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	P	T
S	G	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	T
W	T	R	Q	I	T	F	S	L	X	I	L	S	E	V
X	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	P	T
Y	T	R	Q	I	T	F	S	L	X	I	L	S	E	V
Z	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	P	T
S	G	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	T
W	T	R	Q	I	T	F	S	L	X	I	L	S	E	V
X	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	P	T
Y	T	R	Q	I	T	F	S	L	X	I	L	S	E	V
Z	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	P	T
S	G	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	T
W	T	R	Q	I	T	F	S	L	X	I	L	S	E	V
X	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	P	T
Y	T	R	Q	I	T	F	S	L	X	I	L	S	E	V
Z	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	P	T
S	G	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	T
W	T	R	Q	I	T	F	S	L	X	I	L	S	E	V
X	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	P	T
Y	T	R	Q	I	T	F	S	L	X	I	L	S	E	V
Z	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	P	T
S	G	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	T
W	T	R	Q	I	T	F	S	L	X	I	L	S	E	V
X	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	P	T
Y	T	R	Q	I	T	F	S	L	X	I	L	S	E	V
Z	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	P	T
S	G	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	T
W	T	R	Q	I	T	F	S	L	X	I	L	S	E	V
X	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	P	T
Y	T	R	Q	I	T	F	S	L	X	I	L	S	E	V
Z	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	P	T
S	G	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	T
W	T	R	Q	I	T	F	S	L	X	I	L	S	E	V
X	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	P	T
Y	T	R	Q	I	T	F	S	L	X	I	L	S	E	V
Z	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	P	T
S	G	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	T
W	T	R	Q	I	T	F	S	L	X	I	L	S	E	V
X	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	P	T
Y	T	R	Q	I	T	F	S	L	X	I	L	S	E	V
Z	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	P	T
S	G	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	T
W	T	R	Q	I	T	F	S	L	X	I	L	S	E	V
X	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	P	T
Y	T	R	Q	I	T	F	S	L	X	I	L	S	E	V
Z	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	P	T
S	G	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	T
W	T	R	Q	I	T	F	S	L	X	I	L	S	E	V
X	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	P	T
Y	T	R	Q	I	T	F	S	L	X	I	L	S	E	V
Z	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	P	T
S	G	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	T
W	T	R	Q	I	T	F	S	L	X	I	L	S	E	V
X	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	P	T
Y	T	R	Q	I	T	F	S	L	X	I	L	S	E	V
Z	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	P	T
S	G	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	T
W	T	R	Q	I	T	F	S	L	X	I	L	S	E	V
X	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	P	T
Y	T	R	Q	I	T	F	S	L	X	I	L	S	E	V
Z	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	P	T
S	G	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	T
W	T	R	Q	I	T	F	S	L	X	I	L	S	E	V
X	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	P	T
Y	T	R	Q	I	T	F	S	L	X	I	L	S	E	V
Z	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	P	T
S	G	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	T
W	T	R	Q	I	T	F	S	L	X	I	L	S	E	V
X	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	P	T
Y	T	R	Q	I	T	F	S	L	X	I	L	S	E	V
Z	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	P	T
S	G	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	T
W	T	R	Q	I	T	F	S	L	X	I	L	S	E	V
X	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	P	T
Y	T	R	Q	I	T	F	S	L	X	I	L	S	E	V
Z	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	P	T
S	G	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	T
W	T	R	Q	I	T	F	S	L	X	I	L	S	E	V
X	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	P	T
Y	T	R	Q	I	T	F	S	L	X	I	L	S	E	V
Z	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	P	T
S	G	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	T
W	T	R	Q	I	T	F	S	L	X	I	L	S	E	V
X	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	P	T
Y	T	R	Q	I	T	F	S	L	X	I	L	S	E	V
Z	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	P	T
S	G	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	T
W	T	R	Q	I	T	F	S	L	X	I	L	S	E	V
X	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	P	T
Y	T	R	Q	I	T	F	S	L	X	I	L	S	E	V
Z	I	M	Q	A	G	X	R	S	L	R	P	Q	P	T
S	G	I	M	Q	A	G	X	R	S					

ES 2 965 652 T3

NS2A-181-Phe específica de D2 PSD65.3 (D2 18881 wt. Lys, nt 4818-C)

3 3528

```

4420 4420 4420 4420 4420 4420 4420 4420 4420 4420 4420
GGAATACACATTTTACCACTACTTGTGTTTACCGTTTCTGTTGATTCGAACTTCTCCCTTATCCTAATCTTGACAGCACGGCTTGTC
S S Q T L T S I S R F S I L V I S G L P F R V S T S I P I S A A R Y T L

```

2 193

4610 4620 4630 4640 4650 4660 4670 4680 4690 4700

4910 4920 4930 4940 4950 4960 4970 4980 4990 5000

5010 5020 5030 5040 5050 5060 5070 5080 5090 5100

5210 5220 5230 5240 5250 5260 5270 5280 5290 5300

Licencia de permiso NSI-200-V01 de DDI PDK-50 (08/1993) GfK, nr.5278-A

```

5318   5320   5330   5340   5350   5360   5370   5380   5390   5400
CTGTCATGCCACATTTCACCATGCGCTCCATCAGCTTCACTGCCAAGCTACRACCTCTTTATCTGCGGCCAACCTTCCACAGTCACCCACT

```

Mutación silenciosa G x T en 5'UTR adicional en semillas maduras y no-maduras

```

S610 S420 S430 S440 S450 S460 S570 S480 S490 S500
ATAGCCTCTACCGCGAACATCCAACTGAACTGAACTGAACTGGGATTTTTTATCACACCCCCCCCCCGAACGAGGCCAATTTCTTC

```

ES 2 965 652 T3

ES 2 965 652 T3

7310 7320 7330 7340 7350 7360 7370 7380 7390 7400
 CTTAGGATCCAAAGCTTGGAAACCGTCCTTGCGCAGTCATGCGCTCTAATGCTGCTGCTCAAGTAACTGATGAGGACTACATGCGCTCTGTGTA
 Y D P X F E K Q S G Q V M L E V L C V T Q V L N M R T T W A L C E

 7410 7420 7430 7440 7450 7460 7470 7480 7490 7500
 GCGTTAACCTTACGCTACCGGCGGCCATTCCACATTGGCGAACCAAATCCGCGGCGTTGCGAACCTTACCGATTCGCGGCGTCAAGCTACGTTTT
 R L Y L A T G P I B T L W E G N P G E F W H T T I A V S M A W I F

 > 885
 7510 7520 7530 7540 7550 7560 7570 7580 7590 7600
 AGACGGGAGTTACTTGGCCGGGCGCTGCCTTCTCTTCTTATTAAGAC
 R G S Y N A G A S L L F S I M N T T N T R R G T S M I S S T L G E

 7610 7620 7630 7640 7650 7660 7670 7680 7690 7700
 AGACATGAAACGCGCGGAACTGCGGAAATCTGAAATTGCGATGCTACGCGAAATCTGAAATGCGGAACTGCGGAACTGCGGAACTGCGGAACTGCG
 E W E S R L N A L G K S E F Q I Y N K S G I Q S V D S T L A K E G

 7710 7720 7730 7740 7750 7760 7770 7780 7790 7800
 CTTTAAAGGGGAGAAACGGGCGCTGCGGCGCTGCGGCGCTGCGGCGCTGCGGCGCTGCGGCGCTGCGGCGCTGCGGCGCTGCGGCGCTGCG
 I K R G E T D H B A V S E G S A K L R W P V E R N N V T P E G R V

 7810 7820 7830 7840 7850 7860 7870 7880 7890 7900
 CTGGACCTCGTTTGGCGAGGGGGCTG
 V S L G C S E G S W S Y T C S G L E K X W V P S V K E L T K G S F G H X

 7910 7920 7930 7940 7950 7960 7970 7980 7990 8000
 ANGAAACCATCCCCATGTCACATATGCTG
 E P I F M S T Y G W N L V S E Q S G V D V F T I P P E K C D T L L

 8010 8020 8030 8040 8050 8060 8070 8080 8090 8100
 GCTGACATAGGGGAACTCATACCCAAATCCACAGCTGGAGCGGAGGAAACACTCGAGCTTAACTTACTAGAAATACTGGAGCTGACAAACAGCTGAA
 C D X G E S S S P N F T V E A G R E T D R V L N L V E N X L N N N T Q

 8110 8120 8130 8140 8150 8160 8170 8180 8190 8200
 TTTTCGCTAAAGCTTTCGAAACCCATATGCGCTTCACTGCTAGAAAATGCGACGCTCTGAAAGGAAATATGCGACGCGCTTATGCGGAACTGCGCT
 F C I K V L N F K M P S V I E K M X A L Q R E Y G G A L V R N P L S

 8210 8220 8230 8240 8250 8260 8270 8280 8290 8300
 CACCAAACTGACACATGCGATGCTG
 R N S T H E M Y W V E N A S G N I V S S V N M I S R M L I N R F I

 8310 8320 8330 8340 8350 8360 8370 8380 8390 8400
 ATTCAGATACAAGAAAGCCAACTTACCGCCGCGATTTGACCTCGGAAACGGAAACCCGCTACATGGGATTGAAACTGAGATAACCCGAAAGATAATT
 M B Y K E A T Y E P D V D L G S G T R N I G I E S E I P N L D I I

 8410 8420 8430 8440 8450 8460 8470 8480 8490 8500
 CGGAAAGAAATGAAATGAAATGAAATGAAATGAAATGAAATGAAATGAAATGAAATGAAATGAAATGAAATGAAATGAAATGAAATGAAATGAA
 G S E E D K I N Q E H S T S W H Y D Q D H P Y K T W A Y H S Y E T

 8510 8520 8530 8540 8550 8560 8570 8580 8590 8600
 CAAACAGACGCTGGCTAGCTCATGCTG
 K Q T G S A S S N V M S V V R L L T E P W D V U P M V T Q M A M T

 8610 8620 8630 8640 8650 8660 8670 8680 8690 8700
 ASACACAGCTG
 D T T P F G Q Q R V F X E K V D T R T Q E P X E C T E K E L N K I T

 8710 8720 8730 8740 8750 8760 8770 8780 8790 8800
 CGACAGCTG
 A E W L N K E L S K E T F R M C T R E E F T B X V R S N A A L G A

 8810 8820 8830 8840 8850 8860 8870 8880 8890 8900
 CCATATTCCTGATGAAACAACTGGAACTGGAACTGGAACTGGAACTGGAACTGGAACTGGAACTGGAACTGGAACTGGAACTGGAACTGGAACTGG
 I F T D E N E W S S A E S A V E D S R F W E L V D N E N N L N L E

 8910 8920 8930 8940 8950 8960 8970 8980 8990 9000
 AGGAAAGCTGAAACATGCTGCTGACATGCTG
 G R C E T C V Y N M M S K R E X K L G S P E K A R G S R A I W Y N

 9010 9020 9030 9040 9050 9060 9070 9080 9090 9100
 TGGCTTGGAAACGGCTTCTG
 W L G S A R F L E F D A L G F L N R D H W F S R E N S L S E V E S E

 9110 9120 9130 9140 9150 9160 9170 9180 9190 9200
 GCGTCCACAGCTG
 CACT

ES 2 965 652 T3

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de polinucleótido que codifica una molécula del virus del dengue-1/dengue-2 vivo, atenuado, modificado, comprendiendo la molécula de polinucleótido una primera secuencia de nucleótidos que codifica 5 proteínas no estructurales de una cepa PDK 53-V del virus del dengue-2 vivo, atenuado, modificado, y una segunda secuencia de nucleótidos que codifica al menos una proteína estructural del dengue-1, en donde la molécula de polinucleótido comprende:
- 10 una mutación de adenina a citosina en la posición 3823 que codifica una leucina en lugar de una isoleucina en la quimera del polipéptido de dengue-1/dengue-2 en la posición de aminoácido 1243 correspondiente a NS2A-116;
- 15 una mutación de adenina a timina en la posición 4407 que codifica un ácido aspártico en lugar de un ácido glutámico en la quimera del polipéptido de dengue-1/dengue-2 en la posición de aminoácido 1437 correspondiente a NS2B-92; y
- 15 una mutación de adenina a guanina en la posición 7311.
2. La molécula de polinucleótido según la reivindicación 1, en donde la molécula de polinucleótido que codifica la quimera de polipéptido de dengue-1/dengue-2 comprende adicionalmente:
- 20 una mutación de citosina a timina en la posición 7148 que codifica una isoleucina en lugar de una treonina en la quimera del polipéptido de dengue-1/dengue-2 en la posición de aminoácido 2351 correspondiente a NS4B-108; y
- 25 una mutación de guanina a citosina en la posición 2384 que codifica una alanina en lugar de glicina en la quimera del polipéptido de dengue-1/dengue-2 en la posición de aminoácido 763 correspondiente a E-483.
3. La molécula de polinucleótido según la reivindicación 1, en donde la molécula de polinucleótido que codifica la quimera de polipéptido de dengue-1/dengue-2 comprende el polinucleótido representado por SEQ ID NO: 30 13.
4. La molécula de polinucleótido según la reivindicación 1 o 3, en donde la molécula de polinucleótido codifica la quimera de polipéptido de dengue-1/dengue-2 representada por SEQ ID NO: 3.
- 35 5. Una molécula polipeptídica codificada por una molécula de polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
6. Una quimera del dengue-1/dengue-2,
- 40 que comprende la molécula polipeptídica según la reivindicación 5, o representado por una molécula de polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
7. Una composición farmacéutica que comprende una molécula de polinucleótido según cualquiera de las 45 reivindicaciones 1-4, una molécula de polipéptido según la reivindicación 5, o una quimera de dengue-1/dengue-2 según la reivindicación 6, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
8. La composición farmacéutica según la reivindicación 7 para uso como medicamento.
- 50 9. La composición farmacéutica según la reivindicación 7 para uso en un método para inducir una respuesta inmune en un sujeto que comprende administrar una cantidad farmacéuticamente aceptable de la composición.
10. Un vector que codifica una molécula de polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
- 55 11. Una línea celular que comprende la molécula de polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o el vector según la reivindicación 10.
12. Una composición inmunogénica que comprende una quimera dengue-1/dengue-2 representada por una molécula de polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 60 13. La composición inmunogénica según la reivindicación 12, que comprende adicionalmente una quimera de dengue-3/dengue-2 representada por una molécula de polinucleótido que codifica una quimera de polipéptido de dengue-3/dengue-2, comprendiendo la molécula de polinucleótido una primera secuencia de nucleótidos que codifica proteínas no estructurales de un cepa PDK-53-V del virus del dengue-2 vivo, atenuado, modificado, y una segunda secuencia de nucleótidos que codifica al menos una proteína estructural del dengue-1, en donde la molécula de polinucleótido comprende:

dengue-3, en donde la molécula de polinucleótido comprende:

una mutación de adenina a timina en la posición 1603 que codifica una serina en lugar de una treonina en la quimera del polipéptido de dengue-3/dengue-2 en la posición de aminoácido 503 correspondiente a E-223; y

5 una mutación de adenina a guanina en la posición 7620.

14. La composición inmunogénica según la reivindicación 13, en donde la molécula de polinucleótido que codifica la quimera de polipéptido del dengue-3/dengue-2 comprende adicionalmente una mutación de guanina a adenina en la posición 6436 que codifica una asparagina en lugar de un ácido aspártico en la quimera de polipéptido de dengue-3/dengue-2 en la posición de aminoácido 2114 correspondiente a NS4A-23.

15. La composición inmunogénica según la reivindicación 13, en donde la molécula de polinucleótido que codifica la quimera de polipéptido de dengue-3/dengue-2 comprende el polinucleótido representado por SEQ ID NO: 15.

16. La composición inmunogénica según la reivindicación 13 o 15 en donde la molécula de polinucleótido codifica la quimera de polipéptido de dengue-3/dengue-2 representada por SEQ ID NO: 9.

20 17. La composición inmunogénica según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16, que comprende adicionalmente una quimera de dengue-4/dengue-2 representada por una molécula de polinucleótido que codifica una quimera de polipéptido de dengue-4/dengue-2, comprendiendo la molécula de polinucleótido una primera secuencia de nucleótidos que codifica proteínas no estructurales de un cepa PDK-53-V del virus del dengue-2 vivo, atenuado, modificado, y una segunda secuencia de nucleótidos que codifica al menos una 25 proteína estructural del dengue-4, en donde la molécula de polinucleótido comprende:

una mutación de adenina a timina en la posición 225;

30 una mutación de adenina a guanina en la posición 3674 que codifica una glicina en lugar de un ácido aspártico en la quimera del polipéptido de dengue-4/dengue-2 en la posición de aminoácido 1193 correspondiente a NS2A-66;

una mutación de citosina a timina en la posición 5391;

35 una mutación de citosina a timina en la posición 6437 que codifica una valina en lugar de una alanina en la quimera del polipéptido de dengue-4/dengue-2 en la posición de aminoácido 2114 correspondiente a NS4A-21,

una mutación de adenina a citosina en la posición 9750, y

40 opcionalmente una mutación de timina a citosina en la posición 7026, y opcionalmente una mutación de adenina a guanina en la posición 3773 que codifica una arginina en lugar de una lisina en la quimera de polipéptido de dengue-4/dengue-2 en la posición de aminoácido 1226 correspondiente a NS2A-99.

45 18. La composición inmunogénica según la reivindicación 17, en donde la molécula de polinucleótido que codifica la quimera del polipéptido de dengue-4/dengue-2 comprende adicionalmente una mutación de citosina a timina en la posición 7538 que codifica una fenilalanina en lugar de una serina en la quimera de polipéptido de dengue-4/dengue-2 en la posición de aminoácido 2481 correspondiente a NS4B-238.

50 19. La composición inmunogénica según la reivindicación 17, en donde la molécula de polinucleótido que codifica la quimera de polipéptido de dengue-4/dengue-2 comprende el polinucleótido representado por SEQ ID NO: 16.

55 20. La composición inmunogénica según una cualquiera de las reivindicaciones 17 o 19, en donde la molécula de polinucleótido codifica la quimera de polipéptido de dengue-4/dengue-2 representada por SEQ ID NO: 12.

21. La composición inmunogénica según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 20, que comprende además una cepa PDK-53-V del virus del dengue-2 vivo y atenuado modificado representada por una molécula de polinucleótido que codifica una molécula polipeptídica de la cepa PDK-53-V del virus del dengue-2 vivo y atenuado modificado, en donde la molécula de polinucleótido comprende:

una mutación de adenina a guanina en la posición 592 que codifica un ácido glutámico en lugar de una lisina en la molécula polipeptídica en la posición 166 del aminoácido correspondiente a prM-52; y

65 una mutación de adenina a guanina en la posición 8803 que codifica una valina en lugar de una isoleucina en la molécula de polipéptido en la posición del aminoácido 2903 correspondiente a NS5-412.

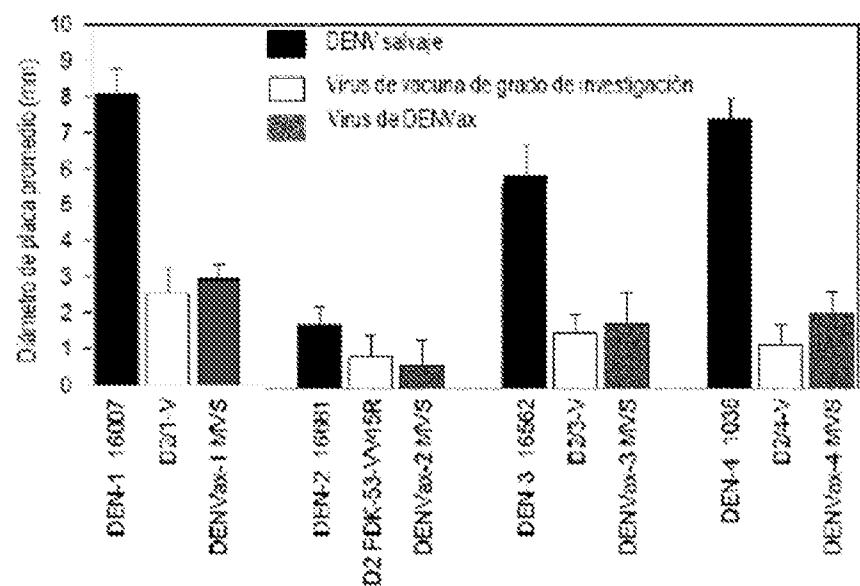
22. La composición inmunogénica según la reivindicación 21, en donde la molécula de polinucleótido que codifica la molécula polipeptídica de la cepa PDK-53-V del virus del dengue-2 viva atenuada modificada comprende además una mutación de guanina a citosina en la posición 6481 que codifica una prolina en lugar de una alanina en la molécula polipeptídica en la posición del aminoácido 2129 correspondiente a NS4A-36.
- 5
23. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 21, en donde la molécula de polinucleótido que codifica la molécula polipeptídica de la cepa PDK-53-V del virus del dengue-2 vivo atenuado modificado comprende el polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 14.
- 10
24. La composición inmunogénica según la reivindicación 21 o 23, en donde la molécula de polinucleótido codifica la molécula polipeptídica modificada, viva atenuada de la cepa PDK-53-V del virus del dengue-2 representada por la SEQ ID NO: 6
- 15
25. La composición inmunogénica según la reivindicación 12 o 24, en donde la composición contiene los cuatro serotipos del virus del dengue, que es una composición tetravalente.
26. La composición inmunogénica según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 25, que comprende adicionalmente una composición inmunogénica contra otros Flavivirus tales como el virus del Nilo Occidental o el virus de la encefalitis japonesa.
- 20
27. Una composición que comprende uno o más quimeras dengue-1/dengue-2 según la reivindicación 6 y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 25
28. La composición según la reivindicación 27, en donde la composición es una composición de virus del dengue tetravalente capaz de inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto contra los cuatro serotipos del virus del dengue.
29. El vector según la reivindicación 10, en donde el vector es un vector plasmídico.
- 30
30. El vector según la reivindicación 10, en donde el vector es un clón infeccioso de ADNc.

ES 2 965 652 T3

三

THE JOURNAL OF CLIMATE

Fig. 2



ES 2 965 652 T3

Fig. 3

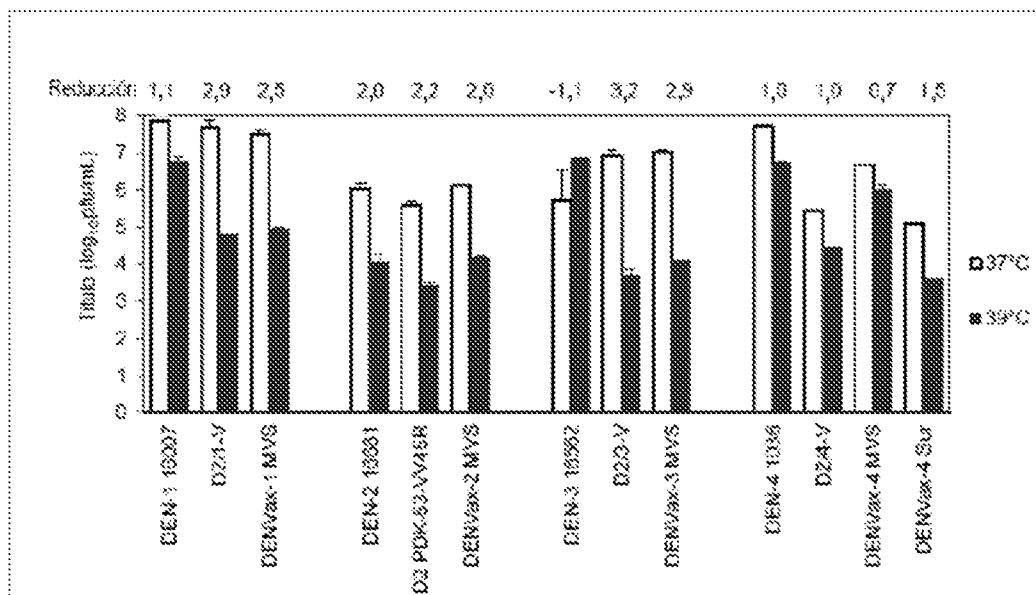


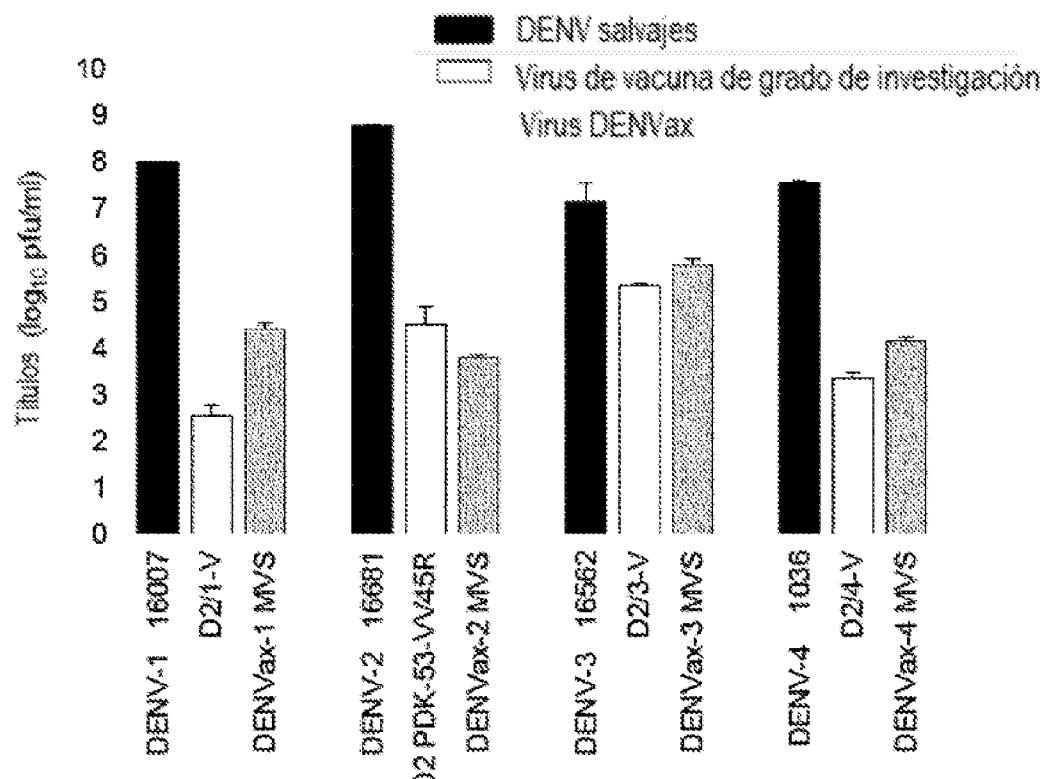
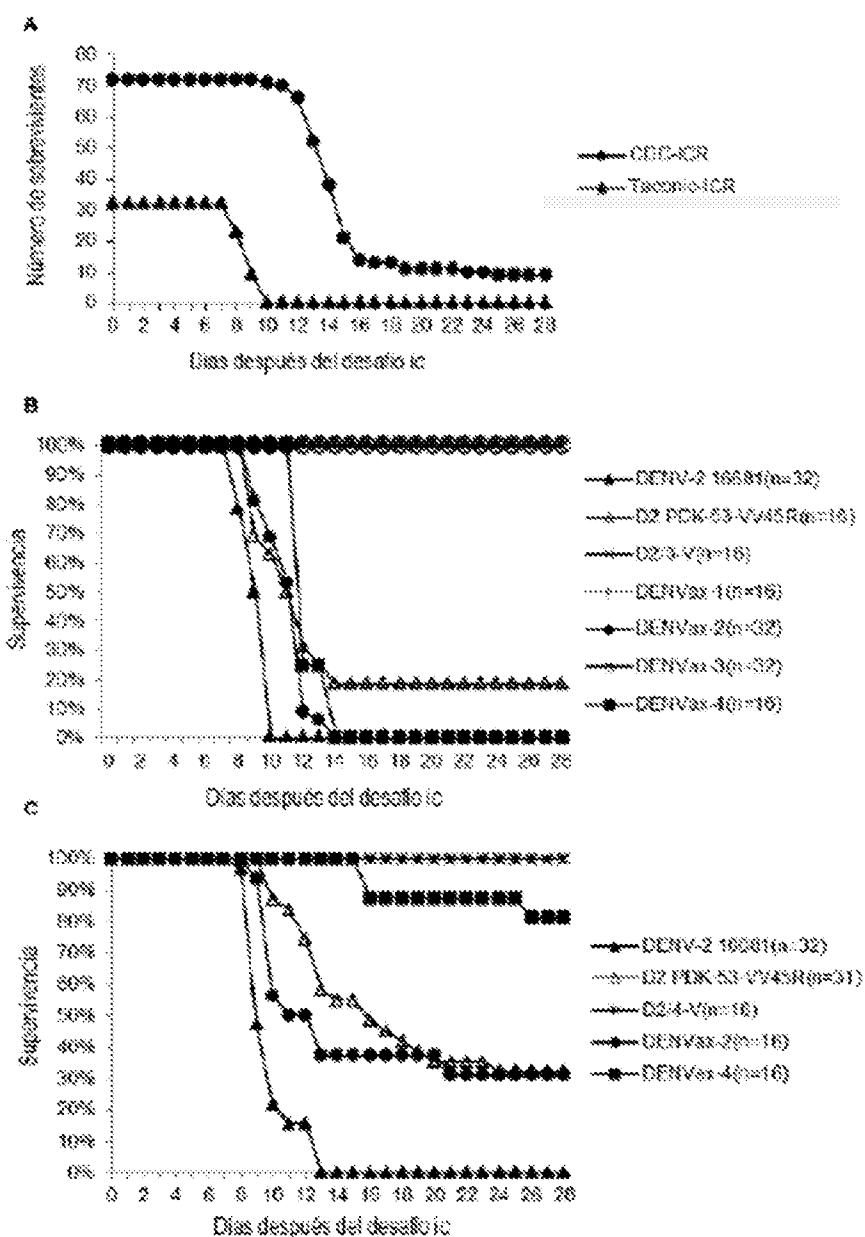
Fig. 4

Fig. 5

ES 2 965 652 T3

Fig. 6

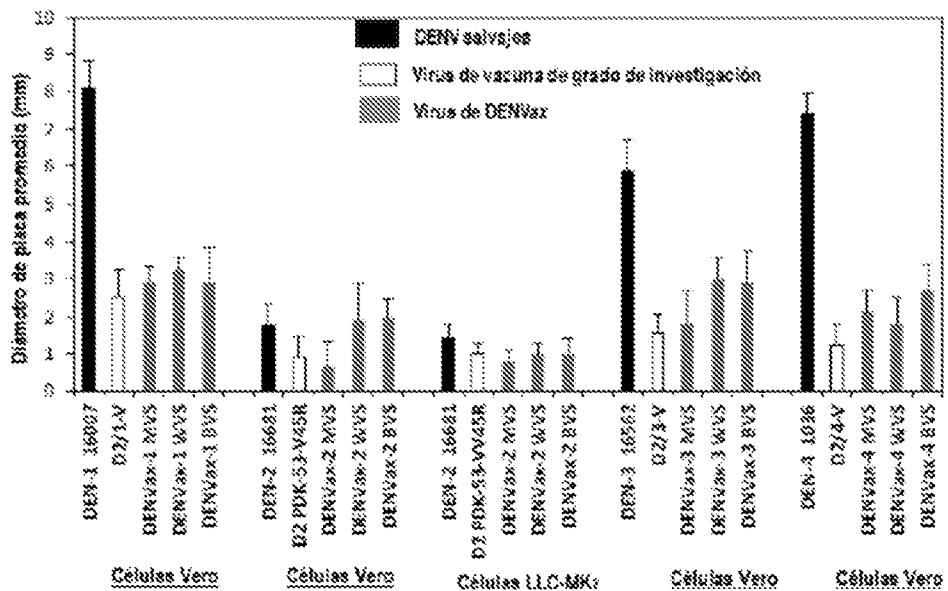


Fig. 7

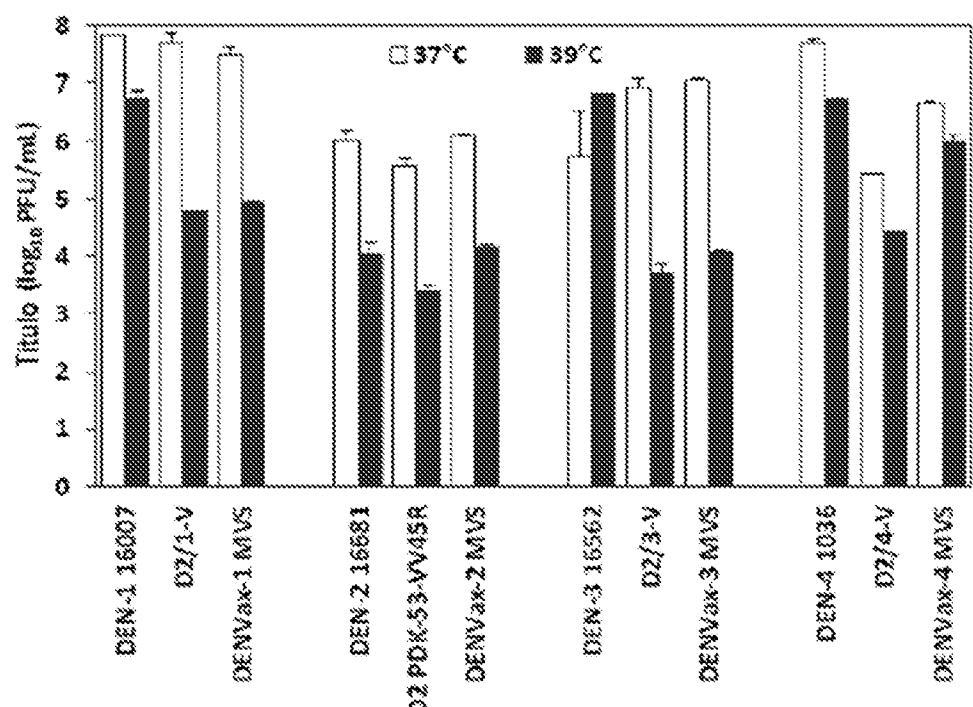


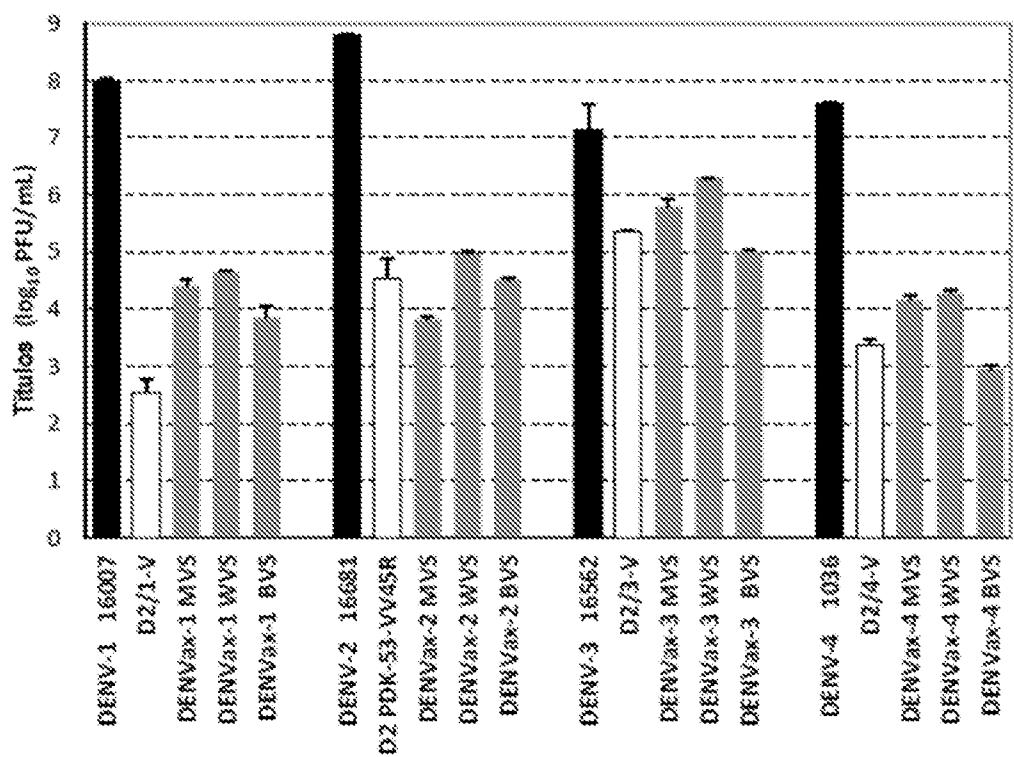
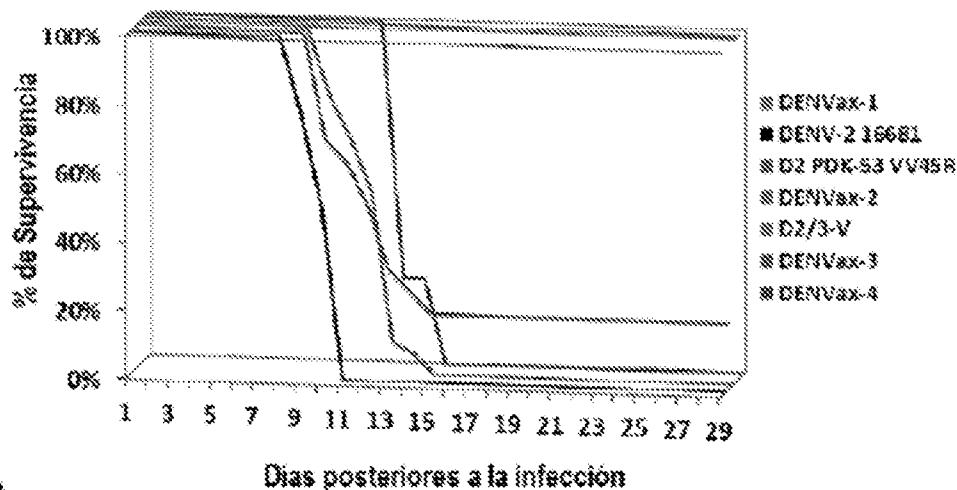
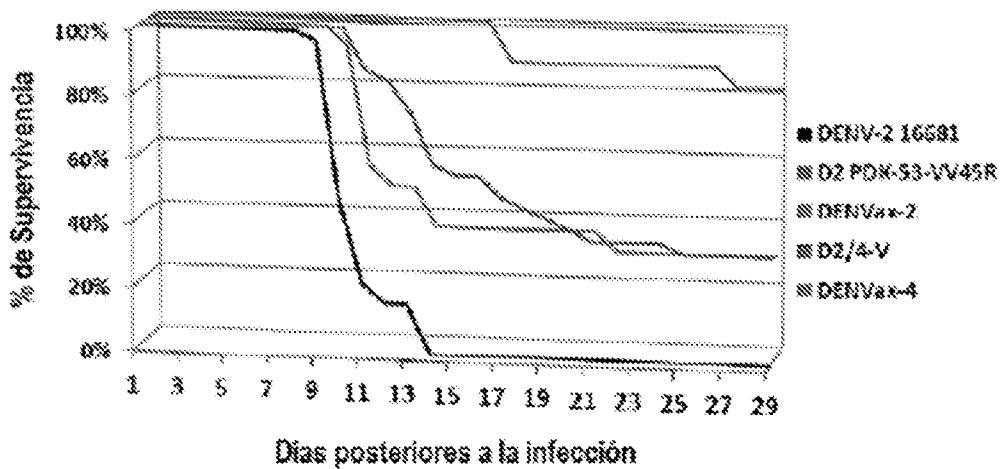
Fig. 8

Fig. 9

A**B**

ES 2 965 652 T3

Fig. 10

Serien-Nr.	Vorlesen und Lesen	43325	73965	52365	52365	52365	52365	52365
34002	388324 68 23222000	C	A	V	C	C	A	C
4028-53	Stress reduziert des PTK des 1388		I	-	V	C	V	C
2396-3	2396-33 V neuerdings neuerdings		V	V	V	X	C	C

Reaktionen der Kinder. Wiederholung der Reaktionen der Kinder 1-2-3
der 1. Klasse (durchgehend in den entsprechenden Zeilen).
Wiederholung der Reaktionen der Kinder unter den gleichen Bedingungen
am Ende der Unterrichtsstunde (durchgehend in den gleichen Zeilen).