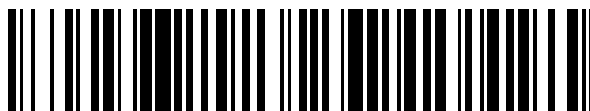


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 478 303**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/29** (2006.01)

**C12P 21/06** (2006.01)

**C07H 21/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.04.2006 E 06751075 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.06.2014 EP 1874346**

54 Título: **Vacunas de flavivirus recombinantes**

30 Prioridad:

**24.04.2005 US 674415 P**

**25.04.2005 US 674546 P**

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

**21.07.2014**

73 Titular/es:

**SANOVI PASTEUR BIOLOGICS, LLC (100.0%)**  
**38 Sidney Street**  
**Cambridge, MA 02139, US**

72 Inventor/es:

**PUGACHEV, KONSTANTIN V.;**  
**GUIRAKHOO, FARSHAD y**  
**MONATH, THOMAS P.**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 478 303 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

Vacunas de flavivirus recombinantes

**Antecedentes de la invención**

5 Los flavivirus son pequeños virus de RNA envueltos de cadena positiva que son transmitidos generalmente por mosquitos y garrapatas infectados. Varios flavivirus, tales como los virus de la fiebre amarilla, el dengue, la encefalitis japonesa, la encefalitis transportada por garrapatas, y el virus del Nilo Occidental, plantean amenazas actuales o posibles para la salud pública mundial. El virus de la fiebre amarilla, por ejemplo, ha sido la causa de epidemias en ciertas localidades de la jungla del África sub-sahariana, así como en ciertas partes de América del Sur. Aunque muchas infecciones por el virus de la fiebre amarilla son leves, el mal puede causar también una enfermedad grave amenazante para la vida. La fase inicial o aguda del estado de enfermedad se caracteriza normalmente por fiebre alta, escalofríos, dolor de cabeza, dolor de espalda, dolor muscular, pérdida de apetito, náuseas, y vómitos. Después de 3 a 4 días, estos síntomas desaparecen. En algunos pacientes, los síntomas reaparecen más tarde, cuando la enfermedad entra en su denominada fase tóxica. Durante esta fase, reaparece la fiebre alta que puede conducir a shock, hemorragias (v.g. hemorragia de la boca, nariz, ojos, y/o estómago), insuficiencia renal, e insuficiencia hepática. De hecho, la insuficiencia hepática causa ictericia, que es un amarilleo de la piel y la parte blanca de los ojos, de donde deriva su nombre de "fiebre amarilla". Aproximadamente la mitad de los pacientes que entran en la fase tóxica mueren en el transcurso de 10 a 14 días. Sin embargo, las personas que se recuperan de la fiebre amarilla tienen inmunidad a lo largo de su vida contra la reinfección. El número de personas infectadas con el virus de la fiebre amarilla a lo largo de las dos últimas décadas ha sido creciente, existiendo en la actualidad aproximadamente 200.000 casos de fiebre amarilla, y aproximadamente 30.000 fallecimientos asociados, cada año. La reaparición del virus de la fiebre amarilla presenta por tanto un grave problema de salud pública.

El virus del Nilo Occidental (WN) tiene una distribución amplia en África, el subcontinente indio, Europa, Ucrania, Rusia, Asia Central, y el Oriente Medio (Monath y Heinz, en *Virology*, 3ª edición, Fields et al., editores, Lippincott-Raven pas. 961-1034, 1995). En 1999, una epidemia sin precedentes de encefalitis en humanos y caballos causada por el virus WN ocurrió en los Estados Unidos (Enserik, *Science* 286: 1450-1451, 1999). Desde entonces, el virus se ha establecido permanentemente en las Américas, afectando aproximadamente a todo el territorio de los Estados Unidos. Hasta ahora, el año de récord en términos de morbilidad/mortalidad en los Estados Unidos fue 2003, con 9862 casos comunicados, de los cuales aproximadamente un tercio fueron acompañados por síntomas neurológicos, y 264 fallecimientos. La enfermedad humana varía desde enfermedad moderada semejante al dengue a meningoencefalitis fatal, ocurriendo la enfermedad más grave en los ancianos. Hasta la fecha, no existe ningún tratamiento farmacológico eficaz contra el virus del Nilo Occidental, y los métodos de vigilancia y prevención no han causado impacto significativo en el número de casos de infección humana. Los riesgos de migración del virus a América del Sur, así como de epidemias en los países subdesarrollados, son extremadamente altos. El desarrollo de una vacuna segura y eficaz contribuirá al control de epidemias futuras.

Los flavivirus, con inclusión del virus de la fiebre amarilla y el virus del Nilo Occidental, tienen dos propiedades biológicas principales responsables de su inducción de estados de enfermedad en humanos y animales. La primera de estas dos propiedades es el neurotropismo, que es la propensión del virus a invadir e infectar el tejido nervioso del hospedador. La infección de flavivirus neutrópicos puede dar como resultado inflamación y lesión del cerebro y la médula espinal (a saber, encefalitis), consciencia deteriorada, parálisis, y convulsiones. La segunda de estas propiedades biológicas de los flavivirus es el viscerotropismo, que es la progresión del virus a invadir e infectar órganos viscerales vitales, que incluyen hígado, riñón, y corazón. La infección de flavivirus viscerotrópicos puede dar como resultado inflamación y lesión de hígado (hepatitis), riñón, (nefritis), y músculo cardíaco (miocarditis), que conducen a insuficiencia o disfunción de estos órganos.

45 El neurotropismo y el viscerotropismo parecen ser propiedades distintas y separadas de los flavivirus. Algunos flavivirus son fundamentalmente neurotrópicos (tales como el virus del Nilo Occidental), otros son fundamentalmente viscerotrópicos (v.g., el virus de la fiebre amarilla y el virus del dengue), y otros exhiben ambas propiedades (tales como el virus de la enfermedad del bosque de Kyasanur). Sin embargo, tanto el neurotropismo como el viscerotropismo están presentes en cierto grado en todos los flavivirus. En un mismo hospedador, es probable que ocurra una interacción entre viscerotropismo y neurotropismo, dado que la infección de las vísceras ocurre antes de la invasión del sistema nervioso central. Así pues, el neurotropismo depende de la capacidad del virus para replicarse en órganos extraneurales (vísceras). Esta replicación extraneural produce viremia, que es responsable a su vez de la invasión del cerebro y la médula espinal.

Los viriones maduros totalmente procesados de los flavivirus contienen tres proteínas estructurales, cápsida (C), membrana (M), y envoltura (E). Siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, y NS5) se producen en las células infectadas. Ambos dominios de fijación y fusión de receptores virales residen en la proteína E. Adicionalmente, la proteína E es también un componente deseable de las vacunas de flavivirus, dado que los anticuerpos contra esta proteína pueden neutralizar la infectividad del virus y conferir protección al hospedador contra la enfermedad. Los flaviviriones inmaduros encontrados en las células infectadas contienen proteína pre-membranal (prM), que es un precursor de la proteína M. Las proteínas de flavivirus se producen por traducción de

un marco de lectura abierta simple y largo para generar una poliproteína, seguido por una serie compleja de escisiones proteolíticas de la poliproteína posteriores a la traducción, para generar proteínas virales maduras (Amberg et al., J. Virol. 73:8083-8094, 1999; Rice, "Flaviviridae," en Virology, Fields et al., ed., Raven-Lippincott, Nueva York, Volumen I, p. 937, 1995). Las proteínas estructurales del virus están dispuestas en la región N-terminal de la poliproteína en el orden C-prM-E, mientras que las proteínas no estructurales están localizadas en la región terminal C, en el orden arriba indicado.

Las vacunas vivas confieren las respuestas protectoras inmunes más potentes y duraderas contra enfermedades causadas por infecciones virales. En el caso de los flavivirus, el desarrollo de una vacuna exitosa requiere que las propiedades de virulencia se modifiquen, a fin de que el virus de la vacuna exhiba neurotropismo y viscerotropismo reducidos para humanos o animales. Se han utilizado varios enfoques diferentes en el desarrollo de vacunas contra flavivirus. En el caso del virus de la fiebre amarilla, se han desarrollado dos vacunas (17D de la fiebre amarilla y la vacuna neutrópica Francesa) por paso seriado (Monath, "Yellow Fever," en Plotkin y Orenstein, Vaccines, 3ª ed., Saunders, Filadelfia, pp. 815-879, 1999). La vacuna 17D de la fiebre amarilla fue desarrollada por paso seriado en tejido de embrión de pollo, y dio como resultado un virus con neurotropismo y viscerotropismo significativamente reducidos. La vacuna neurotrópica Francesa fue desarrollada por paso seriado del virus en tejido cerebral de ratón, y dio como resultado la pérdida de viscerotropismo, pero retenía neurotropismo. De hecho, una alta incidencia de accidentes neurológicos (encefalitis post-vacunal) estaba asociada con el uso de la vacuna Francesa.

Otro enfoque para la atenuación indica la construcción de flavivirus quiméricos, que incluyen componentes de dos (o más) flavivirus diferentes. Se han producido flavivirus quiméricos que incluyen proteínas estructurales y no estructurales de diferentes flavivirus. Por ejemplo, la denominada tecnología ChimeriVax™ emplea la cápsida del virus 17D de la fiebre amarilla y proteínas no estructurales para suministrar la proteína de la envoltura (prM y E) de otros flavivirus (véase, v.g. Chambers et al., J. Virol. 73: 3095-3101, 1999). De hecho, esta tecnología ha sido utilizada para desarrollar candidatos de vacuna contra los virus del dengue, el virus de la encefalitis Japonesa (JE), el virus del Nilo Occidental, y el virus de la encefalitis de San Luis (SLE) (véase, v.g., Pugachev et al., en Nueva Generation Vaccines, 3ª ed., Levine et al.; eds., Marcel Dekker, Nueva York, Basilea, pp. 559-571, 2004; Chambers et al., J. Virol. 73:3095-3101, 1999; Guirakhoo et al., Virology 257:363-372, 1999; Monath et al., Vaccine 17:1869-1882, 1999; Guirakhoo et al., J. Virol. 74:5477-5485, 2000; Arroyo et al., Trends Mol. Med. 7:350-354, 2001; Guirakhoo et al., J. Virol. 78:4761-4775, 2004; Guirakhoo et al., J. Virol. 78:9998-10008, 2004; Monath et al., J. Infect. Dis. 188:1213-1230, 2003; Arroyo et al., J. Virol. 78:12497-12507, 2004; y Pugachev et al., Am. J. Trop. Med. Hyg. 71:639-645, 2004). Éstas son vacunas de virus vivos, que, análogamente a la vacuna YF17D, provocan respuestas inmunes fuertes humorales y celulares dirigidas contra un virus heterólogo deseado. Basándose en la caracterización exhaustiva de ChimeriVax™-JE y las vacunas del dengue, se ha observado que las características principales de las vacunas ChimeriVax™ incluyen la capacidad de replicarse hasta títulos elevados en células sustrato (7 log<sub>10</sub> pfu/ml o mayores), neurovirulencia baja en ratones recién destetados y lactantes (significativamente menores comparadas con YF17D), alta atenuación en los test formales en monos para neurovirulencia y viscerotropismo, elevada estabilidad genética y fenotípica *in vitro* e *in vivo*, replicación ineficiente en los mosquitos, lo cual es importante para prevenir la propagación incontrolada en la naturaleza, y la inducción de inmunidad protectora fuerte en ratones, monos, y humanos después de administración de una sola dosis, sin efectos secundarios graves post-inmunización.

En otros enfoques para la atenuación, se ha emprendido la mutagénesis de flavivirus, con inclusión de flavivirus quiméricos. Se han descrito varios enfoques experimentales para atenuación de patógenos de flavivirus tipo salvaje (véase, v.g., revisado por Pugachev et al., Int. J. Parasitol. 33: 567-582, 2003). Por ejemplo, se ha encontrado que mutaciones en ciertos aminoácidos de la proteína de la envoltura de flavivirus quiméricos que incluyen proteínas de la cápsida y no estructurales del virus de la fiebre amarilla y proteínas membranales y de la envoltura del virus de la encefalitis Japonesa, un virus del dengue, o virus del Nilo Occidental reducen el viscerotropismo (véase, v.g., WO 03/103571 y WO 2004/045529). Otro enfoque, aplicado originalmente al virus 4 del dengue de tipo salvaje, implica deleciones largas de 30 nucleótidos o más en la región 3' no traducida (3'UTR; Men et al., J. Virol. 70: 3930-3937, 1996; Patente U.S. No. 6.184.024 B1). Una de estas deleciones, denominada deleción delta 30 o Δ30, se estudió ulteriormente en el contexto de los virus dengue-4 y dengue-1 tipo salvaje y un virus quimérico dengue-4/WN (Durbin et al., AJTMH 65:405-413, 2001; Whitehead et al., J. Virol. 77:1653-1657, 2003; Pletnev et al., Virology 314:190-195, 2003; WO 03/059384; WO 03/092592; WO 02/095075). Adicionalmente, se encontró que algunas de las deleciones largas en 3'UTR (de 417-616 nucleótidos de longitud) introducidas en la encefalitis tipo salvaje transportada por garrapatas (TBE) y virus Langat son fuertemente atenuantes en un modelo de ratón (Mandl et al., J. Virol. 72:2132-2140, 1998; Pretnev, Virology 282: 288-300, 2001). Una cantidad limitada de datos *in vitro* fue publicada para el virus de la vacuna YF17D. Específicamente, Bredenbeek y co-autores demostraron que una deleción larga de los tres elementos de la secuencia de repetición (RS) de la 3'UTR (188 nucleótidos de longitud; la localización de los elementos RS se ilustra en Fig. 1A) o una deleción de 25 nucleótidos del elemento 2 de secuencia conservada (CS2) no excluía la replicación del virus en las células BHK, mientras que otras tres deleciones (de 25-68 nucleótidos de longitud) que afectaban a CS1 o al tallo-bucle del extremo 3' eran letales (Bredenbeek, et al., J. Gen. Virol. 84: 1261-1268, 2003). Otros han demostrado que mutaciones introducidas en la estructura tallo-bucle larga del terminal 3' de la 3'UTR del flavivirus (dengue) daban como resultado atenuación, mientras que retenían la capacidad del virus para inmunizar al hospedador (Markoff et al., J. Virol. 76: 3318-3328, 2002).

Un segundo enfoque que fue descrito para atenuación de un virus TBE altamente patógeno tipo salvaje utilizaba deleciones relativamente largas en la proteína C de la cápsida, como ha sido descrito por Kofler y colaboradores,

que introdujeron una serie de deleciones en la proteína C del virus TBE y recuperaron varios mutantes viables (Kofler et al., J. Virol. 76: 3534-3543, 2002). Específicamente una deleción de 16 aminoácidos en el dominio hidrófobo central de la proteína (Hélice I predicha; véase en Fig. 2A) reducía drásticamente la replicación del virus en las células BHK y reducía significativamente la neuroinvasividad en los ratones. La inmunización con este mutante TBE protegía los ratones contra la exposición a la cepa TBE altamente patógena Hypr (> 100 DL<sub>50</sub>) (Kofler et al., J. Virol. 76: 3534-3543, 2002).

Actualmente no están disponibles vacunas aprobadas para muchos flavivirus médicamente importantes que tienen propiedades viscerotrópicas, tales como el virus del Nilo Occidental, el dengue, y la fiebre hemorrágica de Omsk, entre otros.

## 10 Sumario de la Invención

La invención proporciona flavivirus quiméricos recombinantes que incluyen una o más mutaciones que proporcionan una pequeña disminución en el viscerotropismo a un flavivirus ya atenuado, como se describe en esta memoria. Un ejemplo de un flavivirus quimérico incluido en la invención es uno que incluye las proteínas de la cápsida y proteínas no estructurales de un primer flavivirus (cepa YF17D del virus de la fiebre amarilla) y las proteínas de la membrana y la envoltura de un segundo flavivirus (encefalitis, cepa NY99 del virus del Nilo Occidental). La proteína de la envoltura del flavivirus quimérico incluye sustituciones en los aminoácidos de la envoltura 107, 316, y 440. Las mutaciones de los flavivirus de la invención son deleciones o sustituciones. Más específicamente, la invención proporciona:

un flavivirus quimérico que comprende un virus de la fiebre amarilla de la cepa YF17D en el cual las proteínas de la membrana y la envoltura del virus de la fiebre amarilla están reemplazadas con las proteínas de la membrana y la envoltura de la cepa NY99 del virus del Nilo Occidental, en donde dicho flavivirus quimérico comprende las mutaciones siguientes:

- (a) las sustituciones L107F, A316V y K440R en la proteína de la envoltura;
- (b) la deleción C2 (deleción de los aminoácidos PSR, residuos 40-42) en la proteína de la cápsida; y

adicionalmente, o bien:

- (c)(i) una deleción en la región 3' no traducida (3'UTR) del genoma de flavivirus quimérico seleccionada de: dB (deleción de CAGGT, nucleótidos 256-260), dD (deleción de CGGAG, nucleótidos 308-312) y d7 (deleción de AAGACGG, nucleótidos 345-351); o
- (c)(ii) las sustituciones Y176V, T177A y K280M en la proteína de la envoltura.

La invención proporciona también

- una composición farmacéutica que comprende un flavivirus de la invención y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable;
- dicha composición farmacéutica para uso en un método para prevención o tratamiento de una infección de flavivirus en un individuo; y
- una molécula de ácido nucleico que comprende el genoma de un flavivirus quimérico de la invención.

Las mutaciones dadas a conocer en esta memoria incluyen mutaciones que están localizadas en regiones de flavivirus recombinantes que incluyen, v.g., la región 3' no traducida de los flavivirus recombinantes e incluyen generalmente menos de 30 nucleótidos. Como un ejemplo de este tipo de mutación, la mutación puede ser una que desestabiliza una estructura de tallo en la región 3' no traducida del virus (v.g., una estructura de tallo en una región no conservada de la región 3' no traducida del virus) o elementos alternativos posibles de estructura secundaria predicha o estructura total. Ejemplos de tales mutaciones incluyen d7, dA, dB, dC y dD, como se describe en esta memoria. En otros ejemplos, la mutación puede incluir uno o más nucleótidos de secuencia conservada 2 (CS2) y por tanto puede ser, por ejemplo, CS2d5 o CS2d16. En otros ejemplos, el flavivirus mutante está adaptado para un sustrato de cultivo celular, dando como resultado una modificación espontánea de una mutación que incluye el mismo (por ejemplo, una deleción, tal como, v.g., una modificación que aumenta la deleción original de 5 nucleótidos en el mutante dC hasta 24 nucleótidos; véase más adelante) o en una mutación de segundo sitio, que no afecta a la atenuación in vivo.

Las mutaciones pueden introducirse también en secuencias de la cápsida. Tales mutaciones pueden incluir, v.g., una deleción de 1-3 aminoácidos de la proteína de la cápsida. Como un ejemplo específico de tales mutaciones, las mutaciones pueden ser una o más deleciones en la Hélice I de la proteína de la cápsida (v.g., la mutación C2, como se describe en esta memoria).

En otros ejemplos, las mutaciones pueden incluir una o más sustituciones de los aminoácidos de la envoltura. En un ejemplo, tales mutaciones de la envoltura son sustituciones en uno o más de los aminoácidos de la envoltura 138,

176, 177, 244, 264, y 280, o combinaciones de los mismos. Ejemplos específicos de tales combinaciones incluyen las siguientes: 176, 177, y 280; 176, 177, 244, 264, y 280; y 138, 176, 177, y 280.

5 Los flavivirus recombinantes pueden incluir mutaciones en una sola de las regiones arriba indicadas, o en dos o la totalidad de estas tres regiones. Adicionalmente, los flavivirus recombinantes pueden incluir una o más mutaciones en la región bisagra de la proteína de la envoltura del flavivirus, y/o una mutación en la proteína de la membrana del flavivirus. Como ejemplos específicos de flavivirus recombinantes de la invención pueden citarse flavivirus que incluyen la mutación C2 en combinación con las mutaciones d7, dB, dD, y/o E#5 (a saber, E176, E177, y E280) (véase más adelante), en el contexto de ChimeriVax™-WN02 (véase también más adelante). Flavivirus recombinantes adicionales que incluyen mutaciones múltiples se describen en otro lugar de esta memoria.

10 La invención proporciona varias ventajas. Los virus sometidos a las mutaciones de la invención son flavivirus vivos atenuados que mantienen la capacidad de infectar células de mamífero. Dado que los virus son infecciosos, es importante asegurarse de que estén suficientemente atenuados, a fin de no producir enfermedad en los individuos vacunados. La presente invención proporciona enfoques para ajuste fino de la atenuación de las vacunas de flavivirus candidatas, haciendo posible así la producción de vacunas seguras. Los flavivirus recombinantes de la  
15 invención son también ventajosos, dado que son relativamente seguros en comparación con las cepas parentales y de tipo salvaje. Esta característica es ventajosa en su uso y administración como vacunas vivas atenuadas, así como con respecto a su preparación y uso como vacunas desactivadas.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción detallada que sigue, los dibujos, y las reivindicaciones.

## 20 Breve Descripción de los Dibujos

Fig. 1A es una representación esquemática de la región 3' no traducida del virus de la fiebre amarilla, que exhibe dominios dentro de esta región (secuencias repetitivas (RS), CS2, CS1, y la estructura tallo-bucle del extremo 3'), así como ejemplos de mutaciones de la invención (v.g., dA, dB, dC, dD, d7, d14, CS2d5, y CS2d16).

25 Fig. 1B es una representación esquemática de la secuencia y estructura secundaria de la región 3' no traducida del virus de fiebre amarilla desde el centro del tercer elemento RS y hasta el extremo de la UTR (Proutski et al., J. Gen. Virol. 78: 1543-1549, 1999).

Fig. 1C es una representación esquemática de la predicción de estructura secundaria óptima YF17D 3' UTR producida utilizando el algoritmo de plegamiento del RNA de Zuker.

30 Fig. 1D es una representación esquemática de los efectos de deleciones 3'UTR (representadas para la deleción dC; método de Zuker) sobre la estructura óptima de YF17D (compárese con Fig. 1C).

Fig. 1E es una representación esquemática del efecto del aumento espontáneo del tamaño de deleción en el virus dC desde 5 nucleótidos (a nivel P2) a 24 nucleótidos (a nivel P5) sobre la estructura secundaria predicha (compárese con Fig. 1D y Fig. 1C). El tamaño incrementado de la deleción daba como resultado una estructura que se asemejaba a la estructura original óptima de YF17D.

35 Fig. 2A es una representación esquemática de la secuencia de la proteína de la cápsida del virus de la encefalitis transportada por garrapatas, así como deleciones en esta proteína consignadas por Kofler et al., J. Virol. 76, 3534-3543, 2002.

40 Fig. 2B es una representación esquemática de la secuencia de la proteína de la cápsida YF17D. Se indican las regiones predichas por análisis mediante computadora que tienen una estructura secundaria de hélice  $\alpha$  (hélices  $\alpha$  I-IV); así como regiones hidrófobas.

Fig. 3 es una representación esquemática de un modelo de homología del homodímero de la proteína YF E, que muestra la localización de residuos que difieren entre el tipo salvaje YF (Asibi) y la cepa de la vacuna YF17D.

45 Fig. 4 es una representación esquemática de las proteínas de la membrana M y de la envoltura (E) del virus del Nilo Occidental, mostrando combinaciones diferentes de mutaciones introducidas en estas regiones por utilización del enfoque de dos plásmidos.

Fig. 5 es un gráfico que muestra la cinética de crecimiento de variantes seleccionadas ChimeriVax™-WN04 y controles de VN02 de Placa Grande (vacuna infraatenuada) y Placa Pequeña.

## Descripción Detallada

50 La presente invención proporciona flavivirus quiméricos recombinantes que pueden utilizarse en métodos terapéuticos, tales como métodos de vacunación. Fundamental para los flavivirus de la invención es la presencia de mutaciones atenuantes en los genomas de los virus. Estas mutaciones pueden atenuar los virus por disminución del viscerotropismo de los virus. Las mutaciones están presentes en regiones del genoma del flavivirus que incluyen la región 3' no traducida (3'UTR), secuencias de la cápsida, y secuencias de la envoltura. Como se expone

adicionalmente más adelante, las mutaciones de la invención se utilizan para ajuste fino de la atenuación de cepas de vacuna que incluyen ya una o más mutaciones atenuantes distintas. Así, por ejemplo, las mutaciones de la invención pueden identificarse por conducir a una disminución en el tamaño de la placa en ensayos de placas y/o viremia reducida en modelos animales (véase más adelante). Las mutaciones de la invención proporcionan por tanto un nivel adicional de seguridad con respecto a la atenuación de tales virus. Detalles de los virus y métodos de la invención se proporcionan más adelante.

El flavivirus de la invención comprende el virus de la fiebre amarilla de la cepa de vacuna YF17D (Smithburn et al., "Yellow Fever Vaccination," World Health Org., p. 238, 1956; Freestone, en Plotkin et al. (eds.), Vaccines, 2ª edición, W. B. Saunders, Filadelfia, 1995). Se conocen también otras cepas del virus de la fiebre amarilla, v.g. YF17DD (No. de Acceso a GenBank U 17066) y YF17D-213 (No. de Acceso a GenBank U17067) (dos Santos et al., Virus Res. 35:35-41, 1995), YF17D-204 Francia (X15067, X15062), YF17D-204, 234 US (Rice et al., Science 229:726-733, 1985; Rice et al., Nueva Biologist 1:285-296, 1989; C 03700, K 02749), y las cepas del virus de la fiebre amarilla descritas por Galler et al., Vaccine 16(9/10): 1024-1028, 1998.

Los flavivirus de la invención son flavivirus quiméricos que incluyen los tipos de mutaciones arriba indicadas. Estas quimeras están constituidas por un flavivirus (a saber, un flavivirus de cadena principal) en el cual una proteína (o proteínas) estructural(es) ha sido reemplazada con una proteína (o proteínas) estructural(es) correspondientes de un segundo virus (a saber un virus de test o un virus predeterminado, tal como un flavivirus; véase, v.g. Patente U.S. No. 6.696.281; Patente U.S. No. 6.184.024; Patente U.S. No. 6.676.936; y Patente U.S. No. 6.497.884). El flavivirus quimérico de la invención está constituido por un flavivirus de la cadena principal (un virus de la fiebre amarilla de la cepa YF17D) en el cual las proteínas de la membrana y la envoltura del flavivirus han sido reemplazadas con la membrana y envoltura de un segundo virus de test (virus del Nilo Occidental de la cepa NY99).

Los flavivirus quiméricos producidos utilizando este enfoque han sido designados como los denominados virus ChimeriVax™. Los siguientes son flavivirus quiméricos conocidos, que se produjeron utilizando la tecnología ChimeriVax™ y fueron depositados con la American Type Culture Collection (ATCC) en Manassas, Virginia, EE.UU. bajo los términos del Tratado de Budapest y se les otorgó una fecha de depósito de 6 de enero de 1998: Chimeric Yellow Fever 170/dengue Type 2Virus (YF/DEN-2; número de acceso en ATCC, ATCC VR-2593) y Chimeric Yellow Fever170/Japanese Encephalitis SA14-14-2 Virus (YF/JE AI.3; número de acceso en ATCC, ATCC VR-2594). Detalles de la producción de virus quiméricos que pueden utilizarse en la invención se proporcionan, por ejemplo, en las publicaciones siguientes: WO 98/37911; WO 01/39802; Chambers et al., J. Virol. 73:3095-3101, 1999; WO 03/103571; WO 2004/045529; Patente U.S. No. 6.696.281; Patente U.S. No. 6.184.024; Patente U.S. No. 6.676.936; y Patente U.S. No. 6.497.884.

Como se ha indicado arriba, las mutaciones de la invención están presentes en las secuencias 3'UTR, la cápsida, y la envoltura de flavivirus quiméricos. Cada uno de estos tipos de mutaciones se describen como sigue.

#### Mutaciones en la Región 3' no Traducida

La organización de la 3'UTR de una cepa de vacuna del virus de la fiebre amarilla, YF17D, que es compartida por todos los virus ChimeriVax™, se muestra en Fig. 1A. La misma incluye ordenadamente desde el extremo 3' (i) una estructura tallo-bucle del extremo 3' que según se ha propuesto actúa como promotor para la síntesis de RNA de la cadena menos y está conservada para todos los flavivirus, (ii) dos elementos de secuencia conservados, CS1 y CS2, que comparten un alto grado de homología de secuencia de nucleótidos con todos los flavivirus transportados por mosquitos, y (iii) exclusivamente para las cepas del virus de la fiebre amarilla de África Occidental, que incluyen el virus de la vacuna YF17D, tres copias de un elemento de secuencia repetitiva (RS) localizado en la porción de aguas arriba de la 3'UTR (Chambers et al., Annu. Rev. Microbiol. 44: 649-688, 1990. La 3'UTR incluye también numerosas estructuras tallo-bucle predichas, tales como las de la región no conservada aguas abajo de los elementos RS, como se representa en Fig. 1B.

Las mutaciones en 3'UTR descritas en esta memoria son generalmente deleciones cortas y atenuantes de, por ejemplo, menos de 30 nucleótidos (v.g. 1, 2, 3, etc., y hasta 29 (v.g., 2-25, 3-20, 4-15, 5-10 ó 6-8 nucleótidos de longitud)). Cuando se introducen individualmente en un candidato de vacuna o se combinan con otras mutaciones atenuantes, las mutaciones pueden dar como resultado un nivel de atenuación adicional, proporcionando así un enfoque para ajustar finamente el nivel de atenuación de un candidato de vacuna. En algunos ejemplos, las deleciones 3'UTR cortas están diseñadas para desestabilizar la estructura secundaria de una o más de las estructuras de tallo predichas en la 3'UTR y/o la estructura de la 3'UTR. Además de deleciones, las mutaciones en tales estructuras pueden incluir también sustituciones que dan análogamente como resultado desestabilización de la estructura de tallo. En ciertos ejemplos, las estructuras tallo-bucle que se someten a mutaciones están presentes en regiones no conservadas de la 3'UTR o en regiones conservadas que pueden tolerar tales mutaciones (v.g., en CS2). Por ejemplo, en el caso de la 3'UTR del virus de la fiebre amarilla (v.g., YF17D), tanto en el contexto de un virus de la fiebre amarilla intacto como de una quimera basada en el virus de la fiebre amarilla, pueden estar presentes mutaciones desestabilizadoras del tallo en una cualquiera o más de las estructuras de tallo representadas en Fig. 1B, que muestra cuatro ejemplos de tales deleciones (dA, dB, dC, y dD), que se describen adicionalmente más adelante. Así, además de estos ejemplos específicos, otros ejemplos de mutaciones en 3'UTR en el virus de la fiebre amarilla incluyen mutaciones que comprenden, v.g., 1-2, 3-8, 4-7, ó 5-6 nucleótidos de las secuencias de tallo siguientes, que

se muestran en Fig. 1B como se lee de 5' a 3': TGGAG, CTCCA, GACAG, TTGTC, AGTTT, GGCTG, CAGCC, AACCTGG, TTCTGGG, CTACCACC, GGTGGTAG, GGGGTCT, AGACCCT, AGTGG, y TTAGACG.

- Además de mutaciones desestabilizadoras del tallo, las mutaciones incluyen también otras deleciones cortas en la 3'UTR. Por ejemplo, ciertas mutaciones caen dentro de la mutación  $\Delta 30$ , arriba descrita. Así, por ejemplo, se describen en esta memoria cualesquiera mutaciones viables que tienen 1, 2, 3, etc., y hasta 29 (v.g., 1-25, 2-20, 3-15, 4-14, 5-13, 6-12, 7-11, 8-10, ó 9) nucleótidos de longitud dentro de esta región. Como ejemplo específico, la invención incluye la deleción d7, en la cual están delecionados los nucleótidos siguientes de esta región en YF17D: nucleótidos 345-351 (AAGACGG; numerando desde el primer nucleótido de la 3'UTR, después del codón de terminación UGA del ORF viral; Fig. 1A). Se describen también mutaciones que incluyen la deleción de, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, ó 5 nucleótidos adicionales desde el extremo 3' ó 5' de esta secuencia. En otros ejemplos, se incluyen deleciones cortas en las secuencias conservadas CS1 y CS2. Estas mutaciones pueden incluir la deleción de, v.g., 1-29, 2-25, 3-20, 4-15, 5-10 ó 6-8 nucleótidos de estas secuencias. Como dos ejemplos específicos, que se describen con mayor detalle más adelante, se delecionan los nucleótidos 360-364 (GGTTA; CS2d5; Fig. 1A) y/o los nucleótidos 360-375 (GGTTAGAGGAGACCCT; CS2d16 Fig. 1A) de CS2de la 3'UTR específica de YF17D. Se describen también mutaciones que incluyen la deleción de, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, ó 5 nucleótidos adicionales desde el extremo 3' ó 5' de esta secuencia. Para otras 3'UTRs de flavivirus, pueden hacerse mutaciones similares, basadas en las estructuras secundarias de las 3'UTR's. Se han publicado predicciones de estructuras secundarias de 3'UTR de otros flavivirus, v.g., para dengue, Kunjin, y TBE (véase, v.g., Proutski et al., *Virus Res.* 64: 107-123, 1999) y HCV (véase, v.g., Kolykhalov et al., *J. Virol.* 70: 3363-3371, 1996). Adicionalmente, numerosas secuencias de nucleótidos 3'UTR para muchas cepas de flavivirus que representan la totalidad de los 4 serocomplejos principales (YF, JE, dengue, y TBE) están disponibles de GenBank. Secuencias de cepas adicionales pueden determinarse por secuenciación de virus. Las estructuras secundarias de estas secuencias pueden predecirse fácilmente utilizando software estándar (v.g. los programas mfold o RNAfold) para revelar las estructuras tallo-bucle posibles que pueden someterse a mutagénesis.
- Como se expone más adelante con mayor detalle, pueden utilizarse mutaciones en 3'UTR para proporcionar atenuación adicional para candidatos de vacuna ya atenuados. Así, pueden producirse una o más de las mutaciones en 3'UTR descritas en esta memoria (v.g. d7, dB, dC y/o dD) para proporcionar un nivel de seguridad adicional a la cepa de la vacuna del virus de la fiebre amarilla YF17D. Opcionalmente, la o las mutaciones en 3'UTR pueden incluirse en esta cepa con una o más mutaciones atenuantes adicionales, tales como una mutación atenuante en la región bisagra de la proteína de la envoltura del virus (v.g., una sustitución de uno cualquiera o más de los aminoácidos de la envoltura 48-61, 127-131, y 196-283, v.g., el aminoácido 279, o uno o más de los aminoácidos de la envoltura en el virus de la fiebre amarilla correspondientes a los aminoácidos 204, 252, 253, 257, 258, y 261 del virus 1 del dengue (véase, v.g., WO 03/103571); la región bisagra de la proteína de la envoltura de flavivirus está comprendida entre los Dominios I y II, véase, v.g., Rey et al., *Nature* 375: 291-298, 1995), un aminoácido en la proteína de la membrana del virus de la fiebre amarilla (por ejemplo, la porción de hélice de la membrana de la proteína membranar, v.g., un aminoácido correspondiente a la posición 66 de la proteína de la membrana del virus del Nilo Occidental), o cualquiera de las mutaciones de las proteínas de la cápsida o la envoltura descritas en esta memoria (v.g., sustituciones de aminoácidos en posiciones correspondientes a los aminoácidos del virus del Nilo Occidental 138, 176, 177, 244, 264, 280, 313, 316, 380, y 440, solos o en combinación).
- De hecho, es posible combinar mutaciones o deleciones especificadas en la 3'UTR con una o más mutaciones o deleciones en el gen de la cápsida (como se describe más adelante), en el gen prM (v.g., en M5 o M60 de las quimeras YF-encefalitis Japonesa, o M66 de quimeras YF-WN o aminoácidos circundantes (véase WO 2006/044857 y más adelante), o en el gen E en sitios que se sabe atenúan los flavivirus. El gen E contiene dominios funcionales dentro de los cuales los cambios de aminoácidos pueden afectar a la función y reducir por consiguiente la virulencia, como ha sido descrito por Hurrelbrink y McMinn (*Adv. Virus Dis.* 60: 1-42, 2003). Las regiones funcionales de la proteína E en las cuales pueden insertarse mutaciones que, junto con las deleciones/mutaciones en 3'UTR descritas en la presente solicitud, pueden dar como resultado una vacuna adecuadamente atenuada incluyen: a) la *región de fijación de receptores* supuesta en la superficie externa del dominio III, b) la *región bisagra molecular* entre los dominios I y II, que determina los cambios de conformación dependientes de ácidos de la proteína E en el endosoma y reducen la eficiencia de la internalización de los virus; c) la *interfaz de las proteínas prM/M y E*, una región de la proteína E que forma interfaz con prM/M después de la transposición de dímero a trímero después de exposición a pH bajo en el endosoma; d) la *punta del dominio de fusión* del dominio II, que está implicado en la fusión a la membrana del endosoma durante eventos de internalización; y e) la *región tallo-ancla*, que está implicada también funcionalmente en cambios de conformación de la proteína E durante los eventos de fusión inducidos por ácidos.
- Las mutaciones en 3'UTR pueden incluirse también en candidatos de vacunas de flavivirus quiméricas. En un ejemplo, que se describe con mayor detalle más adelante, se incluye una o más de las mutaciones en 3'UTR descritas en esta memoria en un candidato de vacuna (al que se hace referencia en esta memoria como ChimeriVax™-WN02) que incluye proteínas de la cápsida y no estructurales del virus de la fiebre amarilla (YF17D) y proteínas de la membrana y la envoltura del virus del Nilo Occidental (NY99), cuya proteína de la envoltura incluye ya mutaciones atenuantes (sustituciones en las posiciones 107, 316, y 440; WO 2004/045529; véase también más adelante). Así pues, la invención incluye ChimeriVax™-WN02 que incluye también, por ejemplo, las mutaciones d7, dB, o dD 3'UTR, en combinación con una mutación de la cápsida, como se describe en esta memoria). Se describen también quimeras en las cuales las proteínas de la membrana y la envoltura son de otro flavivirus, tal como un virus

de la encefalitis Japonesa (v.g., SA14-14-2), un virus del dengue (virus 1, 2, 3, 4 del dengue), u otro flavivirus descrito en esta memoria.

Así pues, la o las mutaciones en 3'UTR pueden incluirse en flavivirus quiméricos con una o más mutaciones atenuantes adicionales, tales como una mutación atenuante en la región bisagra de la proteína de la envoltura del virus (v.g., una sustitución de uno cualquiera o más aminoácidos correspondientes a los aminoácidos del virus de la fiebre amarilla 48-61, 127-131, y 196-283, v.g. el aminoácido 279, o uno o más de los aminoácidos en la proteína de la envoltura correspondientes a los aminoácidos 204, 252, 253, 257, 258, y 261 del virus 1 del dengue (véase, v.g., WO 03/103571)), un aminoácido en la proteína de la membrana (por ejemplo, la porción de hélice de la membrana de la proteína membranal, v.g., un aminoácido correspondiente a la posición 66 de la proteína de la membrana del virus del Nilo Occidental), o cualquiera de las mutaciones de proteínas de la cápsida o la envoltura descritas en esta memoria (v.g., sustituciones de aminoácidos en posiciones correspondientes a los aminoácidos 138, 176, 177, 244, 264, y 280 del virus del Nilo Occidental, solos o en combinación). Ejemplos específicos de virus fuertemente atenuados que contienen combinaciones de tipos diferentes de mutaciones atenuantes se describen más adelante. Estos representan flavivirus quiméricos fiebre amarilla-Nilo Occidental de la invención, en los cuales la delección C2 en la proteína de la cápsida está combinada con las delecciones d7, dB o dD en la 3'UTR, o con la combinación E#5 de cambios de aminoácidos en la proteína de la envoltura (cambios de los aminoácidos E176, E177, y E280).

#### Mutaciones de la cápsida

Como se expone más adelante en esta memoria, se encontró que mutaciones de delección cortas en la proteína de la cápsida podrían utilizarse también para proporcionar atenuación ulterior para un candidato de vacuna ya atenuado. Así, la invención proporciona flavivirus quiméricos que incluyen una delección corta en la proteína de la cápsida. Ejemplos de tales mutaciones, proporcionadas con referencia a la proteína de la cápsida del virus YF17D, incluyen delecciones viables que afectan a la Hélice I de la proteína (véase Fig. 2A). La mutación específica utilizada en la invención es la mutación C2, e incluye una delección de los aminoácidos PSR de la Hélice I (Fig. 2A). Otras mutaciones cortas en esta región pueden ensayarse en cuanto a viabilidad y atenuación, y se exponen también en esta memoria. Las secuencias de proteínas de la cápsida de otros flavivirus han sido publicadas, v.g., para los virus TBE, WN, Kujin, JE, y del dengue (v.g. Pletnev et al., *Virology* 174: 250-263, 1990).

En el caso de las mutaciones en 3'UTR expuestas anteriormente, las mutaciones de la proteína de la cápsida se introducen en una cepa de la vacuna del virus de la fiebre amarilla (YF17D), en combinación con una o más de las mutaciones siguientes: mutaciones en 3'UTR de la invención (d7, dB, o dD); o mutaciones atenuantes en la proteína de la envoltura del virus (sustitución de los aminoácidos de la envoltura correspondientes a las posiciones 176, 177 y 280 del virus del Nilo Occidental NY99).

Las mutaciones en la proteína de la cápsida pueden introducirse en flavivirus quiméricos. En un ejemplo, que se describe con mayor detalle más adelante, la mutación C2 de la cápsida descrita en esta memoria se incluye en un candidato de vacuna (al que se hace referencia en esta memoria como ChimeriVax™-WN02) que incluye proteínas de la cápsida y no estructurales del virus de la fiebre amarilla (YF17D) y proteínas de la membrana y la envoltura del virus del Nilo Occidental (NY 99), cuya proteína de la envoltura incluye ya mutaciones atenuantes (sustituciones en las posiciones 107, 316, y 440; WO 2004/045529; véase también más adelante). Así, la invención incluye ChimeriVax™-WN02 que incluye la mutación C2 en combinación con una o más mutaciones en 3'UTR o mutaciones adicionales de la envoltura, como se describe en esta memoria. Es decir, las combinaciones construidas y caracterizadas de la delección C2 con las delecciones d7, dB, o dD en la 3'UTR, o con la combinación E#5 de cambios de aminoácidos en la proteína de la envoltura.

Se describen también quimeras en las cuales la proteína de la membrana y la envoltura son de otro flavivirus, tal como un virus de la encefalitis Japonesa (v.g., SA14-14-2), un virus del dengue (virus 1, 2, 3, ó 4 del dengue), u otro flavivirus descrito en esta memoria).

#### Mutaciones de la envoltura

Como se expone en otro lugar de esta memoria, se han descrito ciertas mutaciones de la envoltura como atenuantes para flavivirus, tales como el virus de la fiebre amarilla (v.g., YF17D) y flavivirus quiméricos. Éstas incluyen mutaciones de la región bisagra (v.g., sustituciones en las posiciones correspondientes a los aminoácidos 48-61, 127-131, 170, 173, 200, 299, 305, 380, y 196-283 del virus de la fiebre amarilla y sustituciones en residuos que revisten la bolsa hidrófoba del dominio II (Hurrelbrink et al., *Adv. Virus Res.* 60:1-42, 2003; Modis et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100:6986-6991, 2003; véase Fig. 3) que incluyen los residuos 52 y 200 en el caso del virus de la fiebre amarilla (Fig. 3), el aminoácido 279 del virus de la encefalitis Japonesa (en el contexto de una quimera basada en la fiebre amarilla), y los aminoácidos 204, 252, 253, 257, 258, y 261 del virus 1 del dengue (véase, v.g., WO 03/103571)), así como sustituciones en los aminoácidos 107, 316, y 440 de la proteína de la envoltura del virus del Nilo Occidental (véase, v.g., WO 2004/045529).

Como se expone más adelante con mayor detalle en los ejemplos, se ha descubierto que las mutaciones (v.g., sustituciones) en secuencias de la envoltura de flavivirus pueden proporcionar también un medio para ajuste fino de la atenuación de un flavivirus ya atenuado. Así, la invención proporciona un flavivirus quimérico que incluye



mutaciones de la proteína de la envoltura que pueden utilizarse para ajustar finamente la atenuación de una vacuna candidato. Dichas mutaciones de la proteína de la envoltura son las sustituciones en las posiciones correspondientes a los aminoácidos 176, 177 y 280 del virus del Nilo Occidental en combinación. Es decir que la totalidad de las tres posiciones 176, 177, y 280 están sustituidas. Mutaciones de la envoltura tales como éstas, que proporcionan una pequeña disminución en la atenuación de un candidato de vacuna ya atenuado se incluyen en posiciones equivalentes en un flavivirus quimérico, como se describe en esta memoria. Estas mutaciones se incluyen con las otras mutaciones que se describen en esta memoria.

Todas las mutaciones descritas para los genes de la cápsida y las 3'UTR's pueden combinarse con mutaciones de la envoltura a fin de producir un virus con un fenotipo atenuado que es menos viscerotrópico (a saber, introduce menos viremia en el hospedador) que cada uno de los virus parentales no combinados. Por ejemplo, en los virus de la invención un mutante C2 (Tabla 2) está combinado con E#7 (Tabla 4) o las deleciones d7, dB o dD 3'UTR (Tabla 1).

#### Otras mutaciones de flavivirus

Además de las mutaciones atenuantes arriba indicadas, se describen también en esta memoria otras mutaciones atenuantes. Esta sección proporciona una descripción más detallada de estas mutaciones.

Ejemplos de mutaciones que pueden incluirse en flavivirus incluyen mutaciones en la región bisagra de la proteína de la envoltura o ciertas mutaciones de las proteínas de membrana. En particular, se ha encontrado que ciertas mutaciones de la región bisagra de la proteína de la envoltura reducen el viscerotropismo. La cadena polipeptídica de la proteína de la envoltura se pliega en tres dominios distintos: un dominio central (dominio I), un dominio de dimerización (dominio II), y un dominio de módulo semejante a inmunoglobulina (dominio III). Las región bisagra está presente entre los dominios I y II y, después de exposición, a pH ácido, sufre un cambio de conformación (de aquí la designación "bisagra") que da como resultado la formación de trímeros de la proteína de la envoltura que están implicados en la fusión de membranas virales y endosómicas, después de absorción del virus por endocitosis mediada por receptores. Antes del cambio de conformación, las proteínas se presentan en la forma de dímeros.

Numerosos aminoácidos de la envoltura están presentes en la región bisagra, incluyendo por ejemplo los aminoácidos 48-61, 127-131, y 196-283 del virus de la fiebre amarilla (Hurrelbrink et al., Adv. Virus Res. 60: 1-42, 2003; Rey et al., Nature 375: 291-298, 1995). Mutaciones atenuantes en cualquiera de estos aminoácidos, o aminoácidos estrechamente circundantes (y aminoácidos correspondientes en otras proteína de la envoltura de flavivirus), pueden estar presentes en los virus. De interés particular son aminoácidos dentro de la bolsa hidrófoba de la región bisagra (Modis et al., publicado en línea antes de la impresión de fecha 20 de mayo 2003, 10.1073/pnas.0832193100. PNAS | 10 de junio 2003 | vol. 100 | no. 12 | 6986-6991). Como ejemplo específico, una sustitución del aminoácido 204 de la proteína de la envoltura (K a R en el virus 1 del dengue), que se encuentra en la bolsa hidrófoba de la región bisagra, en un flavivirus quimérico que incluye secuencias del dengue 1 insertadas en un vector del virus de la fiebre amarilla da como resultado atenuación. Esta sustitución conduce a una alteración en la estructura de la proteína de la envoltura, de tal modo que el enlace de hidrógeno intermolecular entre un monómero de la envoltura y otro en la proteína tipo salvaje sufre disrupción y se reemplaza con nuevas interacciones intramoleculares dentro de los monómeros. Así pues, pueden utilizarse sustituciones adicionales para aumentar las interacciones intramoleculares en la bolsa hidrófoba, que conducen a atenuación. Ejemplos de tales mutaciones/sustituciones que pueden hacerse en la bolsa hidrófoba, en combinación con las mutaciones de la invención, incluyen sustituciones en E202K, E204K, E252V, E253L, E257E, E258G, y E261H.

Además de las mutaciones en 3'UTR, la cápsida, y/o la envoltura arriba indicadas, los flavivirus pueden incluir también una o más mutaciones atenuantes en la proteína de la membrana, v.g. en un aminoácido correspondiente al aminoácido 66 de la proteína de la membrana del virus del Nilo Occidental, y/o en otros aminoácidos dentro de la hélice de la membrana predicha (v.g., en uno cualquiera o más aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 40-75 del virus del Nilo Occidental). Como ejemplo específico, en el caso de una proteína de la membrana del virus del Nilo Occidental, el aminoácido 66 de la proteína de la membrana (leucina en el virus del Nilo Occidental de tipo salvaje) puede reemplazarse con otro aminoácido, tal como prolina. Además de prolina, otros aminoácidos hidrófobos, tales como isoleucina, metionina, o valina, o aminoácidos pequeños tales como alanina o glicina, pueden sustituir al aminoácido tipo salvaje en la posición 66 de la proteína de la membrana. Como otros ejemplos, aminoácidos de las posiciones 60, 61, 62, 63, y/o 64 del virus del Nilo Occidental (o posiciones correspondientes en otros flavivirus) pueden sustituirse, solos o unos combinación con otros, con una mutación en la posición 66, y otra u otras mutaciones. Ejemplos de sustituciones en estas posiciones incluyen: arginina a glicina en la posición 60, valina a alanina en la posición 61, valina a ácido glutámico o metionina en la posición 62, fenilalanina a serina en la posición 63, y valina a isoleucina en la posición 64. Otro ejemplo incluye una mutación de arginina a cisteína en la posición 60 de la proteína de membrana específica de JE en el virus ChimeriVax™-JE, que se encontró aumenta la estabilidad genética de la vacuna durante la fabricación en gran escala.

Además de una o más de las mutaciones de la proteína de membrana arriba indicadas, los virus pueden incluir también una o más mutaciones adicionales. Por ejemplo, en el caso del virus del Nilo Occidental, una o más de tales mutaciones adicionales pueden encontrarse en la región de la posición 107 (v.g., L a F), 316 (v.g., A a V), o 440 (v.g., K a R) (o una combinación de las mismas) de la proteína de la envoltura del virus del Nilo Occidental. Así, las mutaciones pueden encontrarse, por ejemplo, en uno o más de los aminoácidos 102-112, 138 (v.g., E a K), 176

(v.g., Y a V), 177 (v.g., T a A), 244 (v.g., E a G), 264 (v.g., Q a H), 280 (v.g., K a M), 311-321, y/o 435-445 de la proteína de la envoltura del Nilo Occidental. Como ejemplo específico, utilizando como referencia la secuencia de la cepa NY99-Flamingo 382-99 del virus del Nilo Occidental (Número de Acceso a GenBank AF196835), la lisina en la posición 107 puede reemplazarse con fenilalanina, la alanina en la posición 316 puede reemplazarse con valina, y/o la lisina en la posición 440 puede reemplazarse con arginina. Mutaciones correspondientes pueden hacerse también en otros flavivirus.

Adicionalmente, los virus pueden incluir también cualesquiera otras mutaciones que pueden ser atenuantes o no, pero son por cualquier otra razón beneficiosas para la vacuna (v.g., para fabricación de vacunas), por ejemplo, cambios de nucleótidos en las UTRs o cambios de aminoácidos en proteínas estructurales o no estructurales que pueden acumularse espontáneamente durante la propagación del virus y ser deseables. Por ejemplo, los autores de la presente invención han observado recientemente un cambio de aminoácido R a C en el residuo 60 que se acumulaba en la vacuna ChimeriVax™-JE durante la fabricación en gran escala en condiciones exentas de suero. Este cambio no afectaba a la inmunogenicidad o atenuación, pero estabilizaba el virus por aumento de su tasa de crecimiento y prevención de la acumulación de una retrogradación indeseable en un residuo tipo salvaje en la proteína de la envoltura (E107).

Pueden hacerse mutaciones en virus utilizando métodos estándar, tales como mutagénesis orientada. Las mutaciones arriba descritas son deleciones y sustituciones, pero pueden utilizarse también otros tipos de mutaciones, tales como inserciones. Además, como se ha indicado arriba, las mutaciones pueden estar presentes aisladamente o en el contexto de una o más mutaciones adicionales. Adicionalmente, aparte de los aminoácidos específicos arriba indicados, las sustituciones pueden hacerse con otros aminoácidos, tales como aminoácidos que pudieran dar como resultado un cambio conservador respecto a los arriba indicados. Sustituciones conservadoras incluyen típicamente sustituciones dentro de los grupos siguientes: glicina, alanina, valina, isoleucina, y leucina; ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina, y glutamina; serina y treonina; lisina y arginina; y fenilalanina y tirosina. Adicionalmente, pueden seleccionarse cambios tanto conservadores como no conservadores para análisis de sus efectos atenuantes basados en los cambios predichos por computadora (utilizando software de modelización de la estructura de las proteínas) que causan en la estructura de rayos X de la proteína E.

Los virus de la presente invención pueden producirse utilizando métodos estándar en la técnica. Por ejemplo, puede introducirse una molécula de RNA correspondiente al genoma de un virus en células primarias, embriones de pollo, o líneas de células diploides, a partir de las cuales (o de los sobrenadantes de las mismas) puede purificarse luego el virus de la progenie. Otro método que puede utilizarse para producir los virus emplea células heteroploides, tales como células Vero (Yasumura et al., *Nihon Rinsho* 21, 1901-1915, 1963). En este método, una molécula de ácido nucleico (v.g., una molécula de RNA) correspondiente al genoma de un virus se introduce en las células heteroploides, se cosecha el virus del medio en el que se han cultivado las células, se trata el virus cosechado con una nucleasa (v.g., una endonucleasa que degrada tanto DNA como RNA, tal como Benzonase™; Patente U.S. No. 5.173.418), el virus tratado con la nucleasa se concentra (v.g. por el uso de ultrafiltración utilizando un filtro que tenga un punto de corte por peso molecular de, v.g., 500 kDa), y el virus concentrado se formula para los propósitos de vacunación. Detalles de este método se proporcionan en WO 03/060088 A2.

Los virus de la invención pueden administrarse como agentes profilácticos primarios en aquellas personas que se encuentran en riesgo de infección, o pueden utilizarse como agentes secundarios para tratamiento de pacientes infectados. Dado que los virus están atenuados, los mismos son particularmente adecuados para administración a "individuos de riesgo" tales como los ancianos, niños, o personas infectadas por HIV. Las vacunas pueden utilizarse también en contextos veterinarios, v.g. en la vacunación de los caballos contra la infección del virus del Nilo Occidental, o en la vacunación de aves (v.g., aves valiosas, en peligro, o domésticas, tales como flamencos, águilas de cabeza blanca y gansos, respectivamente). Adicionalmente, las vacunas de la invención pueden incluir un virus, tal como un virus quimérico, que incluye una mutación particular, en una mezcla con virus que carecen de tales mutaciones.

La formulación de los virus de la invención puede llevarse a cabo utilizando métodos que son estándar en la técnica. Numerosas soluciones farmacéuticamente aceptables para uso en la preparación de vacunas son bien conocidas y pueden adaptarse fácilmente para uso en la presente invención por los expertos en esta técnica (véase, v.g., *Remington's Pharmaceutical Sciences* (edición 18ª), editado por A. Gennaro, 1990, Mack Publishing Co. Easton, PA). En dos ejemplos específicos, los virus se formulan en Sal de Medio Esencial Mínimo de Earle (MEME) que contiene 7,5% de lactosa y 2,5% de seroalbúmina humana, o MEME que contiene 10% de sorbitol. Sin embargo, los virus pueden diluirse simplemente en una solución fisiológicamente aceptable, tal como solución salina estéril o solución salina tamponada estéril. En otro ejemplo, los virus pueden administrarse y formularse, por ejemplo, de la misma manera que la vacuna 17D de la fiebre amarilla, v.g., como una suspensión clarificada de tejido de embrión de pollo infectado, o un fluido cosechado a partir de cultivos de células infectados con un virus quimérico.

Las vacunas de la invención pueden administrarse utilizando métodos que son bien conocidos en la técnica, y cantidades apropiadas de las vacunas a administrar pueden ser determinadas fácilmente por los expertos en la técnica. Lo que se determina como cantidad apropiada del virus a administrar puede determinarse por consideración de factores tales como, v.g., el tamaño y el estado general de salud del individuo al que va a administrarse el virus. Por ejemplo, los virus de la invención pueden formularse con soluciones acuosas estériles que contienen entre  $10^2$  y

10<sup>8</sup>, v.g., 10<sup>3</sup> a 10<sup>7</sup>, unidades infecciosas (v.g., unidades formadoras de placas o dosis infecciosas en cultivo de tejido) en un volumen de dosis de 0,1 a 1,0 ml, para ser administradas, por ejemplo, por las rutas intramuscular, subcutánea, o intradérmica. Adicionalmente, dado que los flavivirus pueden ser capaces de infectar el hospedador humano por rutas mucosales, tales como la ruta oral (Gresikova et al., "Tick-borne Encephalitis," en *The Arboviruses, Ecology and Epidemiology*, Monath (ed.), CRC Press, Boca Ratón, Florida, 1988, Volumen IV, 177-203), los virus se pueden administrar también por rutas mucosales. Adicionalmente, las vacunas de la invención pueden administrarse en una sola dosis u, opcionalmente, la administración puede implicar el uso de una dosis de cebado seguida por una dosis de refuerzo que se administra, v.g., 2-6 meses más tarde, como se determine que es apropiado por los expertos en la técnica.

Opcionalmente, adyuvantes que son conocidos por los expertos en la técnica pueden utilizarse en la administración de los virus de la invención. Adyuvantes que pueden utilizarse para mejorar la inmunogenicidad de los virus incluyen, por ejemplo, formulaciones de liposomas, adyuvantes sintéticos, tales como (v.g., QS21), muramildipéptido, lípido monofosforilado A, polifosfazina, oligonucleótidos CpG, u otras moléculas que parecen actuar por activación de moléculas Receptoras de Tipo Peaje (TLR) en la superficie de las células o sobre membranas nucleares en el interior de las células. Aunque estos adyuvantes se utilizan típicamente para mejorar las respuestas inmunes a vacunas desactivadas, los mismos pueden utilizarse también con vacunas libres. Tanto los agonistas como los antagonistas de TLRs pueden ser útiles en el caso de vacunas vivas. En el caso de un virus suministrado por una ruta mucosal, por ejemplo por vía oral, pueden utilizarse como adyuvantes mucosales tales como la toxina termolábil de *E. coli* (LT) o derivaciones mutantes de LT. Adicionalmente, genes que codifican citocinas que tienen actividades adyuvantes pueden injertarse en los virus. Así, genes que codifican citocinas tales como GM-CSF, IL-2, IL-12, IL-13 o IL-5, pueden insertarse junto con genes de antígenos extraños para producir una vacuna que dé como resultado respuestas inmunes mejoradas, o para modular la inmunidad dirigida más específicamente hacia respuestas celulares, humorales, o mucosales.

La invención está basada, en parte, en los resultados experimentales siguientes.

## Resultados Experimentales y Ejemplos

### Antecedentes y Sumario

En un ejemplo de la invención, se realizaron mutaciones tales como las descritas anteriormente en un candidato de vacuna de flavivirus quimérica, al que se hace referencia en esta memoria como ChimeriVax™-WN02, que comprende las proteínas de la cápsida y proteínas no estructurales de un virus de la fiebre amarilla (YF17D) y las proteínas premembranales y de la envoltura de un virus del Nilo Occidental (NY99) como se describe más adelante en esta memoria. Este candidato de vacuna ha sido ensayado en estudios preclínicos y estudios clínicos de Fase I. Aunque el mismo parecía fuertemente atenuado e inmunógeno en ratones y monos rhesus, el mismo inducía una replicación más activa en los monos cinomolgus y en varios individuos voluntarios humanos en pruebas de Fase I (N = 45) comparado con una vacuna de la fiebre amarilla de control (YF) 17D como se dictaminó por viremia post-inoculación. Aun cuando el mismo era bien tolerado en la prueba de Fase I y altamente inmunógeno, basado en los niveles de viremia, se realizaron estudios para mejorar adicionalmente el perfil de seguridad de ChimeriVax™-WN02 por medio de mutagénesis específica, con el fin de obtener una ligera disminución en la viremia en animales pequeños (hámsters) comparada con la variante ChimeriVax™-WN02. Se emplearon tres enfoques de mutagénesis, cada uno de los cuales se expone en los ejemplos que se presentan más adelante. En un primer enfoque, se introdujeron pequeñas deleciones de nucleótidos en la región 3' no traducida del virus (la 3'UTR). En un segundo enfoque, se introdujeron deleciones de aminoácidos en la proteína de la cápsida. En un tercer enfoque, se introdujeron sustituciones específicas de aminoácidos atenuantes en la proteína de la envoltura del virus. Como se expone con mayor detalle más adelante y en otro lugar de esta memoria, estos tipos de mutaciones pueden combinarse unos con otros (y otras mutaciones atenuantes o beneficiosas por otras razones) para fabricar los virus de la invención.

### ChimeriVax™-WN02

Se construyó una quimera YF17D/WN inicial que contenía la secuencia del gen prM-E tipo salvaje de la cepa NY99 del virus WN, designada ChimeriVax™-WN01, utilizando un sistema estándar de dos plásmidos (Arroyo et al., *J. Virol.* 78: 12497-12507, 2004). Las secuencias del gen prM-E específico de JE en los plásmidos pYF5'3'IV/SA14-14-2 (que contiene porciones 5' y 3' de cDNA para el virus de la vacuna ChimeriVax™-JE) y pYFM5.2/SA14-14-2 (que contiene una gran porción intermedia de ChimeriVax™-JE-cDNA) se reemplazaron con las secuencias de cDNA correspondientes del parental NY99 WN. Se obtuvo el virus ChimeriVax™-WN01 por ligación in vitro de fragmentos a partir de los plásmidos pYWN5'3'N1Δ3 y pYWN5.2/5 resultantes para obtener un molde de DNA de longitud total, seguido por transcripción y transfección in vitro de células Vero por los transcritos de RNA resultantes. Se demostró que el nuevo virus quimérico estaba significativamente atenuado para ratones y monos rhesus en comparación con WN NY99 e YF17D, aunque el mismo conservaba un grado ligero de neurovirulencia para los ratones adultos. El mismo se atenuó ulteriormente por la introducción de tres cambios de aminoácidos específicos de la vacuna SA14-14-2 JE en los residuos E107, E106, y E140 (véase la Tabla 3 más adelante) de la proteína (E) de la envoltura. Los dos nuevos plásmidos que contenían estas mutaciones se designaron pYWN5'3'NF3Δ2 y pYWN5.2-316/440#2. Basándose en los resultados de los tests del mutante triple resultante, designado ChimeriVax™-WN02, en ratones y

monos, se llegó a la conclusión de que el mismo estaba atenuado significativamente para ser ensayado posteriormente en pruebas clínicas de Fase I. las pruebas se realizaron en adultos sanos (N = 30 para dosis de inoculación de 5 log<sub>10</sub> pfu y N = 15 para la dosis de 3 log<sub>10</sub> pfu). Inesperadamente, varios de los individuos voluntarios inoculados en ambos grupos de dosis desarrollaron viremia que era mayor en un grado estadísticamente significativo (hasta 3,5 veces) comparada con el control YF-Vax. Esto indicaba que, aunque la vacuna era bien tolerada e inmunógena, podría hacerse un desarrollo ulterior a fin de obtener una variante de la vacuna ChimeriVax™-WN más atenuada. Los niveles de viremia elevados pueden ser indicativos de una replicación excesiva del virus en órganos periféricos, y pueden presentar cierto riesgo de desarrollar síntomas hemorrágicos en un subconjunto de individuos vacunados, similares a la fiebre amarilla clásica, o encefalitis debida al hecho de atravesar la barrera hematoencefálica, lo cual puede verse facilitado por una viremia alta basándose en el conocimiento de los flavivirus encefalitogénicos.

Así pues, el único parámetro subóptimo de la vacuna ChimeriVax™-WN02 era una viremia ligeramente más alta que la esperada post-inoculación observada en una proporción de voluntarios humanos, que puede ser indicativa de una replicación excesiva en órganos periféricos (viscerotropismo). Dado que el virus ChimeriVax™-WN02 de partida es ya un candidato de vacuna muy atenuado, en lugar de un aislado virulento de tipo salvaje, se procuró identificar una o más mutaciones nuevas que no atenuaran excesivamente la vacuna. Los inventores buscaron mutaciones que previnieran la aparición de viremia elevada en uno o más modelos animales apropiados (en el experimento descrito más adelante se utilizaron hámsters) y subsiguientemente en humanos, pero sin reducir significativamente la eficacia.

Los pasos experimentales implicados en la producción y caracterización de nuevos candidatos ChimeriVax™-WN04 incluían:

- Construcción de DNAs plasmídicos que contenían las mutaciones deseadas. Específicamente, todas las mutaciones se introdujeron en los plásmidos ChimeriVax™-WN02 iniciales pYWN5'3'NF3Δ2 y pYWN5.2 316/440#2 por mutagénesis estándar dirigida por oligonucleótidos utilizando técnicas de PCR simple o solapante, seguido por ligación de los productos PCR resultantes en estos plásmidos y selección de plásmidos mutantes por clonación en *E. coli* y secuenciación de clones individuales.
- Ligación in vitro de fragmentos grandes EagI-BspEI de plásmidos apropiados de las series pYWN5'3' y pYWN5.2 para obtener moldes de cDNA de longitud total, seguido por linealización con XhoI.
- Transcripción in vitro de los moldes de DNA de longitud total con RNA-polimerasa SP6 para producir RNA sintético infeccioso.
- Producción de virus mutantes ChimeriVax™-WN04 por transfección de células Vero utilizando lipofectamina o electroporación y cosechando muestras de virus del paso 1 (P1), seguido por un paso adicional en medio exento de suero para obtener stocks de virus P2.
- Confirmación de la viabilidad del virus mutante por monitorización del efecto citopático (CPE), el ensayo de placas de los sobrenadantes de células, y la detección de RNA viral por una RT-PCR sensible.
- Confirmación de la presencia de las mutaciones deseadas por secuenciación de consenso del RNA genómico viral al nivel P2 (y análisis preliminar de la estabilidad genética por secuenciación de virus sometidos a pasos al nivel P5).
- Análisis de la morfología de las placas y propiedades de crecimiento por titulación estándar de virus P2 en células Vero.
- Análisis de viscerotropismo en hámsters Sirios inoculados con 5 log<sub>10</sub> pfu/dosis de muestras de virus P2 por medida de la viremia post-inoculación los días 1-9; y análisis de inmunogenicidad por medición de los títulos de anticuerpos neutralizantes específicos del virus WN en suero el día 30 utilizando el test estándar de neutralización por reducción de placas al 50% (PRNT<sub>50</sub>).

Como se describe más adelante, se introdujeron deleciones en la 3'UTR o la proteína de la cápsida (C) del virus ChimeriVax™-WN02, en un esfuerzo para conseguir un efecto atenuante muy ligero en este candidato de vacuna altamente atenuado demostrado. Esto se consiguió por deleciones pequeñas, de 5-16 nucleótidos de longitud, en la 3'UTR o deleciones de 3 aminoácidos en la proteína C. Algunas de las deleciones en la 3'UTR eran deleciones cortas (5-6 nucleótidos) que se diseñaron sobre la base de una estructura secundaria predicha de la 3'UTR del virus YF17D (Proutski et al., J. Gen. Virol. 78: 1543-1549, 1999). Éstas tenían por objetivo desestabilizar específicamente algunas de las estructuras específicas tallo-bucle predichas por computadora en el centro de la 3'UTR localizadas fuera de cualesquiera elementos de secuencia conservados. En un tercer enfoque, se introdujeron mutaciones atenuantes SA14-14-2 adicionales en la proteína E de ChimeriVax™-WN02, que era el mismo método utilizado para desarrollar ChimeriVax™-WN02 a partir de ChimeriVax™-WN01. Los efectos de estas modificaciones se monitorizaron en un modelo de hámster. Se identificaron variantes de ChimeriVax™-WN04 que daban como resultado una pequeña reducción deseada en el viscerotropismo en los hámsters.

## Construcción de candidatos ChimeriVax™-WN04-3'UTR por introducción de deleciones específicas en la 3'UTR

Como se ha expuesto anteriormente, la organización de la 3'UTR específica de YF17D compartida por todos los virus ChimeriVax™ se muestra en Fig. 1A. La misma contiene por este orden desde el extremo 3' (i) una estructura de tallo y bucle en el extremo 3' conservada para todos los flavivirus, (ii) dos elementos de secuencia conservados, CS1 y CS2, y (iii) tres copias de un elemento de secuencia repetitiva (RS) localizado en la porción aguas arriba de la 3'UTR (Chambers et al., Annu. Rev. Microbiol. 44: 649-688, 1990) Una característica valiosa de las deleciones en esta región es su estabilidad, dado que la retrogradación espontánea durante la replicación del virus es virtualmente imposible. Las 11 deleciones introducidas por los inventores en el virus ChimeriVax™-WN02 (utilizando el plásmido pYWN5'3'NF3Δ2) para generar nuevos candidatos ChimeriVax™-WN04-3'UTR se muestran en Fig. 1A e incluyen:

10 - una deleción dRS que elimina los tres elementos RS (nucleótidos 18-164, ATAACCGGG...-... TCCACAC, de la 3'UTR de YF17D; la numeración se hace desde el primer nucleótido 3'UTR después del codón de terminación TGA del ORF viral);

15 - cuatro deleciones pequeñas de 5-6 nucleótidos: dA (nucleótidos 229-234, GCAGTG), dB (nucleótidos 256-260, CAGGT), dC (nucleótidos 293-297, CCAGA), y dD (nucleótidos 308-312, CGGAG) que se encuentran entre las RSs y CS2, designadas para desestabilizar las estructuras individuales tallo-bucle/pseudonudo predichas por computadora (Proutski et al., J. Gen. Virol. 78: 1543-1549, 1999) que se muestran en Fig. 2B;

20 - una deleción larga de 105 nucleótidos, d105 (nucleótidos 218-321, TAAGCT ... - ... CCGCTA), que elimina la mayoría de los nucleótidos entre las RSs y CS2 (una deleción similar era tolerada por DEN4 de tipo salvaje, pero reducía significativamente la replicación in vitro e in vivo (Men et al., J. Virol. 70: 3930-3937, 1996) y por consiguiente se esperaba que la misma pudiera ser superatenuante para ChimeriVax™-WN02);

- una deleción de 30 nucleótidos, d30 (nucleótidos 322-351, CCACCC ... - ... GACGG), aguas arriba de la CS2, mimetizando la mutación Δ30 descrita originalmente para atenuar el virus DEN4 tipo salvaje (Men et al., J. Virol. 70: 3930-3937, 1996; Patente U.S. No. 6.184.024 B1);

25 - dos deleciones más pequeñas, d7 (nucleótidos 345-351, AAGACGG) y d14 (nucleótidos 338-351, TGGTAGAAAGACGG), en la región Δ30, que se ensayaron debido a que se esperaba que la mutación d30 arriba descrita podría atenuar excesivamente ChimeriVax™-WN02 in vitro y/o in vivo;

- dos pequeñas deleciones de 5 y 16 nucleótidos en la región CS2 designadas CS2d5 (nucleótidos 360-364, GGTTA) y CSd16 (nucleótidos 360-375, GGTTAGAGGAGACCCT).

30 La viabilidad de los virus mutantes se monitorizó por observación cuidadosa al microscopio de CPE durante los pasos P1 y P2, así como pasos subsiguientes hasta P5 realizados para evaluar la estabilidad genética de mutantes viables y para determinar si cualesquiera mutaciones de segundo sitio podrían restablecer la viabilidad de mutantes aparentemente no viables. Estas observaciones se confirmaron por RT-PCR y ensayo de placas en células Vero. El ensayo de placas proporcionó también información importante acerca de los títulos de virus mutantes indicativos de propiedades de crecimiento en células Vero y sobre cambios en la morfología de las placas causados por las deleciones introducidas. Porciones relevantes de los genomas de virus viables se secuenciaron a los niveles P2 y P5. Los resultados de estos experimentos se resumen en la Tabla 1.

Basándose en los datos de la Tabla 1, se llegó a las conclusiones siguientes:

40 1) A pesar del gran tamaño de la deleción dRS, la misma no proporcionaba atenuación acusada alguna in vitro, debido a que el virus mutante producía placas grandes y claras, similares a las del control ChimeriVax™-WN02 LP (control de placa grande; véase nota al pie 1 de la Tabla 1), y crecía hasta un título relativamente alto de  $6 \times 10^6$  pfu/ml. Este resultado era de esperar, debido a que una deleción similar no tenía prácticamente efecto alguno sobre la replicación del virus YF17D in vitro (Bredenbeek et al., J. Gen. Virol. 84:1261-1268, 2003), y una deleción larga similar no reducía la neurovirulencia del virus ChimeriVax™-JE en ratones lactantes.

45 2) Las deleciones pequeñas, dA, dB, dC y dD, causaban atenuación acusada in vitro a juzgar por la morfología de placas. Los tamaños de placa de la totalidad de los 4 virus mutantes se reducían; las placas del virus dD eran opacas (las placas de los controles LP y SP de WN02 eran ambas claras). Los virus crecían hasta títulos relativamente altos durante el paso P2 en el exceso de  $6 \log_{10}$  pfu/ml, lo cual es una característica deseable para fabricación (Tabla 1; excepto para el título de mutantes dA, que no pudo determinarse debido que formaba placas demasiado diminutas para poder ser contadas en este experimento). Estos resultados indicaban que las estructuras tallo-bucle/pseudonudo predichas (Fig. 1B) existen de hecho y son importantes para la replicación del flavivirus. En contraste con el virus DEN4 de tipo salvaje, que toleraba grandes deleciones en esta región aguas arriba de CS2 (Men et al., J. Virol. 70: 3930-3937, 1996), la deleción larga d105, que abarcaba todos los elementos estructurales direccionados por deleciones pequeñas, era superatenuante (letal) para el virus ChimeriVax™-WN02.

55 3) La deleción d30, que es análoga a la mutación Δ30 (Men et al., J. Virol. 70: 3930-3937, 1996; Patente U.S. No. 6.184.024 B1), así como una deleción d14 más corta, en la región CS2 inmediatamente precedente, eran

letales. La única mutación en esta región que era tolerada por ChimeriVax™-WN02 era la delección pequeña d7. La misma era atenuante dado que reducía la morfología de las placas.

4) Las pequeñas delecciones CS2d5 y CS2d16 tenían efectos atenuantes moderados in vitro, dado que los mutantes que contenían la delección formaban placas opacas de tamaño intermedio. Era de esperar que estas mutaciones afectasen a la estructura tallo-bucle predicha que incluye la secuencia del sitio de restricción XbaI en el nucleótido 10.708, como se muestra en Fig. 1B.

En estos experimentos, se demostró por primera vez que las delecciones pequeñas fuera de los fragmentos conservados de la 3'UTR pueden proporcionar cierto grado de atenuación. Adicionalmente, se demostró por primera vez que la desestabilización específica de estructuras tallo-buce/pseudonudo individuales predichas da como resultado atenuación. Adicionalmente, existen muchas estructuras tallo-buce/pseudonudo predichas en la 3'UTR de los flavivirus, con inclusión del virus YF17D, que proporciona una gran diversidad de oportunidades para conseguir una gama de efectos atenuantes. Estas estructuras, o áreas entre estructuras, pueden ser direccionadas ahora por pequeñas delecciones que pueden ser introducidas por los expertos en la técnica. Puede esperarse ahora la mutagénesis de cualquiera de estas estructuras basándose en el descubrimiento de los inventores, a fin de proporcionar cierto grado de atenuación. La elección del intervalo de efectos permite la selección de un mutante con un grado de atenuación deseado.

Tabla 1. Características in vitro de los mutantes de delección ChimeriVax™-WN04- 3'UTR

Mutación	Viabilidad del mutante	Título de P2, pfu/ml	Morfología de Placa
dRS	viable	6x10 <sup>6</sup>	grande, transparente
dA	viable	N/D <sup>2</sup>	diminuta
dB	viable	6,3x10 <sup>6</sup>	más pequeña que el control SP
dC	viable	1,5x10 <sup>6</sup>	diminuta
dD	viable	6,6x10 <sup>5</sup>	intermedia, opaca
CS2d5	viable	1,2x10 <sup>7</sup>	intermedia, opaca
CS2d16	viable	5,3x10 <sup>5</sup>	intermedia, opaca
d7	viable	5,2x10 <sup>6</sup>	más pequeña que el control SP
d14	no viable	N/A	no se observan placas
d30	no viable	N/A	no se observan placas
d105	no viable	N/A	no se observan placas
WN02 LP de control <sup>1</sup>			grande, transparente
WN02 SP de control <sup>1</sup>			pequeña, transparente

<sup>1</sup> Los virus de control LP y SP (utilizados para comparación de la morfología de placas únicamente en el ensayo de placas) se aislaron previamente por purificación de placas a partir de una muestra de virus de fabricación ChimeriVax™-WN02 P5 que era una población de placas grandes (LP) y placas pequeñas (SP); la variante SP parecía debida a acumulación de un cambio de aminoácido Leu a Pro en M66.

<sup>2</sup> N/D - no determinado debido a que las placas eran demasiado pequeñas cuando se tiñeron con rojo neutro el día 5 después de la infección para ser contadas exactamente.

Debería indicarse que las estructuras secundarias verdaderas de las 3'UTRs de Flavivirus, con inclusión del virus YF17D, se desconocen, debido a que no existe método disponible alguno para demostrar experimentalmente su existencia en el contexto de virus enteros, y por consiguiente las predicciones publicadas, v.g., la única predicha para YF17D por Proutski y colaboradores (Fig. 1B), pueden ser incorrectas. Pueden predecirse muchas estructuras alternativas para formar en una molécula de RNA relativamente larga (Zuker et al., N.A.R. 19: 2707-2714, 2001), y es posible que se formen diferentes estructuras (en cadenas más o menos) y funcionen en diferentes pasos del ciclo vital del virus. Las estructuras verdaderas pueden verse influenciadas por la formación de diversos pseudonudos (Olsthoorn et al., RNA 7: 1370-1377, 2001) e interacciones de RNA de largo alcance (v.g., ciclación de RNA y otras interacciones (Álvarez et al., J. Virol. 79: 6631-6643, 2005)), así como posibles interacciones de RNA con proteínas del hospedador y virales. Para complicar más la interpretación de los resultados publicados de predicciones teóricas

por computadora, se utilizan a menudo operaciones manuales, tales como plegamiento inicial de secuencias parciales con forzamiento subsiguiente de las estructuras predichas inicialmente en estructuras de secuencias de RNA más largas, el uso artificial de N's durante los pasos de plegamiento iniciales, y la selección subjetiva de elementos estructurales preferidos (v.g., Mutebi et al., J. Virol. 78: 9652-9665, 2004). A este fin, los inventores plegaron la secuencia de RNA 3'UTR de YF17D empleando el algoritmo de predicción de Zuker utilizado comúnmente. La estructura óptima predicha se muestra en Fig. 1C, que difiere de la predicción de Proutski que se muestra en Fig. 1B. Es importante que las deleciones pequeñas dA, dB, dC, dD, d7, y d14 en Figs. 1A y 1B desestabilizaban generalmente la estructura óptima nativa de YF17D (Fig. 1C) y estructuras subóptimas. Un ejemplo de una estructura óptima alterada de este tipo (para el mutante dC) se muestra en Fig. 1D. En contraste, las deleciones CS2d5 y CS2d16 (Figs. 1A y 1B) no cambiaban apreciablemente la estructura nativa óptima, lo que indicaba que estas deleciones pueden atenuar el virus (la atenuación se demostró en el modelo de hámster para ChimeriVax™-WN) por alteración de la secuencia de CS2 *per se* más bien que la estructura de 3'UTR o, alternativamente, por alteración de algunas estructuras subóptimas. Así pues, aun cuando algunas de las deleciones se designaron basándose en la predicción de la estructura de Proutski (Fig. 1B), su efecto real puede ser debido a desestabilización de elementos estructurales distintos de los tallo-bucles predichos en Fig. 1B.

Después que el mutante dC se sometió a pasos desde el nivel de paso P2 a P5 en células Vero exentas de suero para analizar la estabilidad genética, y de la secuenciación del virus P5, se encontró que la deleción de 5 nucleótidos aumentaba espontáneamente en longitud hasta 24 nucleótidos (nucleótidos 277-300, TCTGGGACCTCCCACCCA delecionados). (Otras deleciones (dRS, d7, CS2d5, CS2d16, dA, dB y dD) eran estables durante los mismos pasos de estabilidad genética.) El efecto del tamaño de deleción incrementado era que la estructura secundaria predicha venía a ser similar a la estructura óptima original de YF17D (Fig. 1E, compárese con Fig. 1C). Este cambio espontáneo parecía ser una adaptación del cultivo de células. Ambas variantes P2 y P5 estaban muy atenuadas y eran inmunógenas en los hámsters (véase nota al pie 4 de la Tabla 5). Así pues, la variante P5 del mutante dC puede tener el fenotipo de vacuna deseado.

25 Construcción de candidatos ChimeriVax™-WN04-C por introducción de deleciones específicas en la proteína C de la cápsida específica de YF17D

El análisis por computadora de los inventores de la estructura de la proteína C de YF17D utilizando los métodos ProteinPredict y Protean predecía que su organización general no difiere sustancialmente de la TBE (Fig. 2B). Los autores de la invención razonaron que las deleciones largas en la proteína de ChimeriVax™-WN02 serían muy probablemente superatenuantes. Por tanto, se introdujeron 5 deleciones pequeñas de 3-4 aminoácidos como se muestra en Fig. 2B (los residuos delecionados están encuadrados). Se introdujeron por ingeniería genética deleciones en el plásmido ChimeriVax™-WN02 pYWN5'3'NF3Δ2, que abarca el gen entero de la proteína C. Las tres primeras deleciones (C1-3; cada una de 3 aminoácidos de longitud) se encuentran en la misma área general descrita para TBE por Kofler et al., J. Virol. 76: 3534-3543, 2002). Sin embargo, los inventores posicionaron las mutaciones de tal modo que permitieran ensayar la importancia de características estructurales específicas: la deleción C1 está localizada aguas arriba tanto del tramo hidrófobo central como de la Hélice I predicha, C2 afecta únicamente a la Hélice I, y era de esperar que C3 interfiriese tanto con la Hélice I como con el tramo hidrófobo central. Adicionalmente, la deleción C4 (de 4 aminoácidos de longitud) se diseñó para direccionar la Hélice III predicha a la porción carboxi-terminal, cargada positivamente de la proteína, y la deleción C5 (de 3 aminoácidos) estaba comprendida entre las Hélices III y IV (la misma elimina también el sitio de escisión de la proteasa viral NS2b/NS3 en el término C de la forma intracelular de la proteína; la misma se introdujo para determinar si cualesquiera mutaciones de segundo sitio podrían compensar el defecto esperado en el procesamiento de la poliproteína).

Los resultados de la caracterización *in vitro* de los mutantes WN04-C se resumen en la Tabla 2. Únicamente eran viables los mutantes C1 y C2, mientras que las deleciones C3-C5 eran letales. Si bien el efecto deletéreo fuerte en la mutación C5 no era sorprendente, era interesante que una pequeña deleción en la porción carboxi-terminal cargada positivamente de la proteína (C4) era letal, lo que sugería que alteraciones secuencia/estructura en esta región no pueden ser toleradas por el virus. La observación más sorprendente fue que la deleción C3 era también letal, debido a que se encuentra en la misma área general que toleraba deleciones largas en el contexto del virus TBE. La presencia de deleciones en las variantes C1 y C2 se confirmó por secuenciación. Los resultados de secuenciación de la región de la proteína estructural entera en los virus a los niveles P2 y P5 se muestran en la Tabla 2. Si bien la variante C1 acumulaba cambios en los residuos M14 y E313, que aparecían como heterogeneidades en el paso P5, pero no P2 (se cree que el cambio en E313 es una adaptación a las condiciones de crecimiento del virus exento de suero observadas previamente que se acumulaban en ChimeriVax™-WN02), la variante C2 parecía ser genéticamente estable. El último virus contenía una heterogeneidad en el residuo M71 tanto en P2 como en P5, pero la ratio de mutante a no mutante (~ 80%) no cambiaba durante el paso. A juzgar por la morfología de placas, la variante C1 no estaba atenuada en comparación con ChimeriVax™-WN02, mientras que la variante C2 aparecía atenuada, dado que formaba pequeñas placas, lo que sugería la importancia de la Hélice I. Ambos mutantes crecían hasta títulos altos en células Vero (~ 7 log<sub>10</sub> pfu/ml). No existe dato previo alguno publicado que indique que tales deleciones pequeñas puedan atenuar un flavivirus o tener un valor práctico. La generación con éxito de mutantes C1 y C2 viables en el presente estudio proporcionó la evidencia de que el virus YF17D o los virus vacunales ChimeriVax™ pueden tolerar pequeñas deleciones aguas arriba de la región hidrófoba central y en el comienzo de la Hélice I.

Tabla 2. Características in vitro de los mutantes ChimeriVax™-WN04-C

Mutación	Viabilidad del mutante	Título de P2, pfu/ml	Morfología de Placa	Secuencia en P2 <sup>2</sup>	Secuencia en P5 <sup>2</sup>
C1	viable	1,9x10 <sup>7</sup>	grande, transparente	deleción OK; ausencia de otras mutaciones	deleción OK; 20% M14 N a H, 40% E313 G a R
C2	viable	1,5x10 <sup>7</sup>	pequeña	deleción OK; 80% M71 A a T	deleción OK; 80% M71
C3	no viable	N/A	no se observan placas	no se observa producto de la RT-PCR	no se observa producto de la RT-PCR
C4	no viable	N/A	no se observan placas	no se observa producto de la RT-PCR	no se observa producto de la RT-PCR
C5	no viable	N/A	no se observan placas	no se observa producto de la RT-PCR	no se observa producto de la RT-PCR
Control de WN02 <sup>1</sup>			grande, transparente		

<sup>1</sup> El virus de control de WN02 (utilizado para comparación de la morfología de placas únicamente en el ensayo de placas) era una muestra P1 obtenida por transfección de células con ChimeriVax™-WN02 en transcritos de RNA in vitro.

5 <sup>2</sup> La región de la proteína estructural entera (genes C-prM-E) se secuenció por el método de consenso a fin de confirmar la deleción propuesta y comprobar la presencia de cualesquiera otros cambios de aminoácidos/heterogeneidades.

Construcción de candidatos ChimeriVax™-WN04-E por introducción de cambios específicos de SA14-14-2 adicionales en la proteína de la envoltura (E)

10 Los residuos de la proteína E que difieren en el virus JE tipo salvaje (Nakayama) y la cepa SA14-14-2 de la vacuna, así como residuos en posiciones correspondientes de WN NY99, se muestran en la Tabla 3. Como se ha expuesto anteriormente, un grado deseado de atenuación de la variante de vacuna ChimeriVax™-WN02 se alcanzó inicialmente por introducción de 3 residuos específicos SA14-14-2, E107, E316, y E440 en la quimera YF17D/WN originalmente construida, que contenía los genes prM-E específicos de la cepa NY99 tipo salvaje (el virus WN01).  
15 ChimeriVax™-WN02 (y WN01) contiene también el residuo Ser E227 coincidente en ambos virus SA14-14-2 y NY99.

Tabla 3. Los residuos SA14-14-2 JE específicos de la vacuna en la proteína de la envoltura E para combinarse en ChimeriVax™-WN04 a fin de reducir el viscerotropismo de ChimeriVax™-WN02<sup>1</sup>

Aminoácido <sup>2</sup>	JE Tipo Salvaje (Nakayama)	Vacuna JE SA14-14-2	WN Tipo Salvaje (NY99)
<b>107</b>	<b>L</b>	<b>F</b>	<b>L</b>
138	E	K	E
176	I	V	Y
177	T	A	T
<b>227</b>	<b>P</b>	<b>S</b>	<b>S</b>
244	E	G	E
264	Q	H	Q
280	K	M	K
<b>316</b>	<b>A</b>	<b>V</b>	<b>A</b>
<b>440</b>	<b>K</b>	<b>R</b>	<b>K</b>

20 <sup>1</sup>Residuos específicos SA14-14-2 ya presentes en ChimeriVax™-WN02 se muestran en negrita; obsérvese que el residuo E227 es el mismo (Ser) en SA14-14-2 y WN NY99 y por tanto no requería cambio por mutagénesis específica.



<sup>2</sup> Los números de aminoácidos se expresan de acuerdo con la numeración en la proteína E del virus WN.

5 Todos los plásmidos contruidos previamente en el proceso de la selección del candidato de vacuna WN02 (Arroyo et al., J. Virol. 78: 12497-12507, 2004) y aquellos que fueron contruidos más recientemente (dos constructos de fondo pYWN5'3' y pYWN5.2) se representan en Fig. 4. Conjuntos deseados de mutaciones SA14-14-2 en la proteína E del virus quimérico se obtuvieron por ligación in vitro de pares específicos de fragmentos de DNA de plásmidos pYWN5'3' y pYWN5.2 apropiados por el sitio de restricción EagI en el gen E, v.g., ChimeriVax™-WN02 se generó por ligación de pYWN5'3'NF3Δ2 y pYWN5.2 316/440#2. Algunas de las combinaciones se han ensayado previamente en ratones y monos, conduciendo a la selección del candidato WN02 para ensayo ulterior en humanos (Arroyo et al., J. Virol. 78: 12497-12507, 2004). La mutación M66 (cambio de Leu a Pro en el residuo 66 de la proteína M) que incorporaron los inventores en los dos nuevos plásmidos pYWN5'3' era una adaptación en cultivo de células que se acumulaba en la vacuna ChimeriVax™-WN02 durante la fabricación en gran escala. La misma reducía el tamaño de placas del virus, pero no tenía efecto alguno sobre la neurovirulencia en el ratón (Arroyo et al., J. Virol. 78: 12497-12507, 2004). De acuerdo con los resultados recientes obtenidos por los inventores de las pruebas en Fase I humana y experimentos adicionales en monos, aquélla reducía el viscerotropismo del virus para los primates y parece por tanto que es una mutación beneficiosa para la eficiencia como vacuna, aumentando la seguridad). Dado que la vacuna ChimeriVax™-WN02 actual es una mezcla de placas grandes y pequeñas, induciendo una viremia ligeramente mayor que la esperada en algunos humanos, se realizó trabajo adicional a fin de reducir el viscerotropismo. Por ejemplo, la variante de placas pequeñas se purificó recientemente en placa y está siendo ensayada actualmente en monos. Variantes contruidas recientemente con combinaciones de mutaciones no ensayadas con anterioridad se describen más adelante.

Tabla 4. Nuevas variantes ChimeriVax™-WN04-E: Mutaciones introducidas y caracterización de los virus in vitro

Virus <sup>1</sup>	Mutaciones pretendidas <sup>2</sup>	Título de P2	Morfología de placa	Secuencia en P2 <sup>4</sup>	Secuencia en P5'
3	WN02+E138	6,1x10 <sup>6</sup>	<L+S	OK, pero posible E166 R/L	95% E166 R a L, 80% E313, E138 K/T
4	WN02+E138+M66	4,0x10 <sup>4</sup>	DIMINUTA	n.d.	n.d.
5	WN02+E176, 177, 280	6,8x10 <sup>7</sup>	<L+S	OK, pero E313 G/R (80%R)	E313, M63 F a S, 50% E167 F a V
5A	WN02+E176, 177, 280	6,75x10 <sup>7</sup>	<L+S	n.d.	n.d.
6R	WN02+E176, 177, 244,264,280	2,15x10 <sup>7</sup>	<L+S	E244 no esperado; E167 F a L, posible E221 L/F, un cambio de nucleótido silencioso	n.d.
6A	WN02+E176, 177, 244, 264, 280	4,0x10 <sup>6</sup>	<L+S		E244 V en lugar de G esperado, E313, 50% M67 (L a S)
7	WN02+E138, 176, 177,280	1,18x10 <sup>7</sup>	<L+S	OK, pero transparente E313 G a R	E313, E166 R a Q, posible traza de E138 E tipo salvaje
7A	WN02+E138, 176, 177,280	6,95x10 <sup>6</sup>	<L+S	n.d.	n.d.
11	La totalidad de los diez residuos SA14-14-2	Nulo	Ninguna	no se observa producto de RT-PCR	no se observa producto de RT-PCR
1R control	WN02	2,45x10 <sup>7</sup>	L+S	OK	n.d.
2 control	WN02+M66	2,95x10 <sup>6</sup>	S	OK, pero E313 G/R	E313, sólo 20% M66 (retrogradación)

<sup>1</sup> Todos los virus se obtuvieron por transfección de células Vero; en las designaciones de los virus, "A" denota una variación en la preparación de DNA molde de longitud total (ligación de 3 fragmentos) y "R" denota un virus obtenido a partir de una transfección repetida; los virus que están sombreados se seleccionaron para ensayo ulterior en hámsters.

5 <sup>2</sup> Residuos WN02 específicos de SA14-14-2: E107, 227, 316, y 440; el cambio M66 es una adaptación en cultivo de células conocida que reduce el tamaño de placa del virus WN02.

<sup>3</sup> L+S, una mezcla aparente de placas grandes y pequeñas (en el virus 1R); S, placas pequeñas; < L+S, las placas parecían ser una mezcla de placas grandes y pequeñas, pero el tamaño global era algo menor que para el virus 1R (L+S).

10 <sup>4</sup> La región de la proteína estructural entera (genes C-prM-E) se secuenció por el método de consenso a fin de confirmar las mutaciones propuestas (confirmadas cada una a no ser que se indique otra cosa); se enumeran otros cambios de aminoácidos/heterogeneidades detectados.

15 Los datos de viabilidad y caracterización in vitro de nuevos constructos ChimeriVax™-WN04-E se resumen en la Tabla 4. El virus 11, en el cual se intentó combinar la totalidad de los 10 residuos específicos SA14-14-2, parecía ser no viable debido a que no inducía CPE después de transfección, no formaba placas en el ensayo de placas durante los pasos subsiguientes, y su RNA genómico no podía detectarse en los sobrenadantes de células por una reacción RT-PCR sensible. Otros nuevos virus que contenían 5 a 9 cambios en SA14-14-2 enumerados en la Tabla 4 eran viables (todas las muestras 3, 4, 5, 6 y 7). La mayoría de éstas parecían ligeramente atenuadas debido a que sus placas eran algo más pequeñas que las placas del control de WN02 (virus 1R), si bien crecían hasta títulos relativamente altos en el exceso 6-7 log<sub>10</sub> pfu/ml; la única excepción era el virus 4, que parecía estar sobre-atenuado (placas diminutas y título muy bajo) debido a la adición simultánea de las mutaciones E138 y M66.

20 Los cambios SA14-14-2 propuestos se confirmaron por secuenciación de consenso en los virus 3, 5, y 7. El virus 6 era curioso porque su muestra 6R carecía de una de las mutaciones propuestas cuando se secuenciaba en P2: tenía un Glu tipo salvaje en el residuo E244 en lugar de Gly (carecía también de dos cambios silenciosos de nucleótido introducidos intencionadamente aguas abajo del triplete E244 para crear un sitio de restricción SphI). Otra muestra, 6A, tenía un Val en el residuo E244 que difiere tanto de la secuencia WN tipo salvaje como de la secuencia SA14-14-2 (tenía el sitio SphI propuesto). Estos cambios en secuencias viales eran inesperados, dado que la región entera específica del virus en la preparación del plásmido pYWN5.2/8mut utilizada para generar 6R, 6A, y 11 en transcritos de RNA in vitro había sido confirmada por secuenciación. Es posible que el cambio específico SA14-14-2 en E244 sea letal para ChimeriVax™-WN, solo o en combinación con algunos otros cambios tales como E264, lo cual podía explicar por qué el virus 11 no pudo recuperarse. Las modificaciones detectadas de este residuo en las muestras 6R y 6A que restablecían la viabilidad podrían ser debidas a un error por la polimerasa viral durante la replicación del virus (muy probablemente el caso para el virus 6A), inestabilidad del plásmido pYWN5.2/8mut en bacterias, o contaminación menor por otro clon bacteriano no revelada por la secuenciación del plásmido. Los virus P2 secuenciados eran relativamente homogéneos, excepto que algunos virus comenzaban a exhibir acumulación de unas pocas mutaciones adicionales, algunas de las cuales podrían esperarse (v.g., el cambio de Ga R en E313, que es una adaptación conocida en cultivo de células exentas de suero de ChimeriVax™-WN que no afecta al fenotipo biológico). Mutaciones más diversas se acumulaban durante la propagación al nivel P5. Basándose en estas observaciones, se seleccionaron los virus 3, 5, 6A, y 7 al nivel P2 (sombreado en la Tabla 4) para ensayo ulterior respecto a viscerotropismo/inmunogenicidad en hámsters.

#### Análisis de viscerotropismo e inmunogenicidad de variantes ChimeriVax™-WN04 en hámsters

40 Se utilizan ratones como modelo animal sensible pequeño a fin de demostrar neurovirulencia reducida, que es un indicador importante de la atenuación, así como inmunogenicidad alta de candidatos de vacuna ChimeriVax™-WN (Arroyo et al., J. Virol. 78:12497-12507, 2004). Sin embargo, este modelo no puede utilizarse para predecir el nivel de viscerotropismo en monos y humanos, que es otro atributo importante de atenuación, dado que las quimeras no inducen viremia detectable en los ratones. Algunos flavivirus inducen viremia de nivel alto en los hámsters, como ha sido demostrado recientemente para el virus WN tipo salvaje (Tesh et al., Emerg. Inf. Dis. 8: 1392-1397, 2002). Los estudios recientes de los inventores utilizando la vacuna ChimeriVax™-WN02 (una mezcla de virus de placas grandes y pequeñas) y variantes LP y SP purificadas en placas demostraron una correlación satisfactoria entre la viremia causada por estos virus en hámsters Sirios hembra y la viremia observada en voluntarios humanos y monos cinomolgus. Específicamente, la variante LP, que está menos atenuada para humanos, inducía una viremia fácilmente detectable en los hámsters, mientras que el virus SP más atenuado inducía una viremia muy baja o indetectable. Se utilizó este nuevo modelo de animal pequeño para investigar si las mutaciones WN04 arriba descritas reducían el viscerotropismo, sin excluir el desarrollo de respuesta inmune anti-WN eficiente.

55 Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con los requerimientos del NIH para tratamiento humano de animales de laboratorio bajo un protocolo aprobado por IACUC Acambis. Se inocularon subcutáneamente (SC) hámsters Sirios hembra de 4 semanas con 5 log<sub>10</sub> pfu de candidatos ChimeriVax™-WN04 seleccionados, así como virus de control NP y SP de WN02 o ~ 4 log<sub>10</sub> pfu de YF17D, seguido por medidas de viremia los días 1, 3, 5, 7, y 9 (los animales se sangraron bajo anestesia y se determinaron los títulos de virus en los sueros cosechados por ensayo de placas) y respuestas de anticuerpos el día 30 medidas por el test de neutralización de la reducción de placas estándar al 50% (PRNT<sub>50</sub>), en animales individuales. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Viremia y respuestas de anticuerpos a variantes ChimeriVax™-WN04 después de inoculación SC de hámsters Sirios hembra

Virus <sup>1</sup>	Hámster No.	Viremia, pfu/ml <sup>2</sup>					Título de viremia pico medio	Duración de viremia media (días)	PRNT <sub>50</sub> (día 30) <sup>3</sup>
		Día	Día	Día	Día	Día			
		1	3	5	7	9			
ChimeriVax™- WN04-C1	1	-	1,75	-	-	-	1,340	3.4	2,560
	2	-	0	125	-	-			>10,240
	3	125	0	-	-	-			1,280
	4	-	1,30	1,250	-	-			1,280
	5	-	0	775	-	-			2,560
<b>GMT</b>		125	5	25	-	-	<b>2,560</b>		
ChimeriVax™- WN04-C2	1	25	300	-	-	-	680	1.4	2,560
	2	-	775	-	-	-			2,560
	3	-	1,10	-	-	-			2,560
	4	-	0	-	-	-			2,560
	5	-	775	-	-	-			5,120
<b>GMT</b>		-	450	-	-	-	<b>2,940</b>		
ChimeriVax™- WN04-dRS	1	-	1,37	-	-	-	1,025	3	>10,240
	2	350	5	-	-	-			1,280
	3	175	1,37	-	-	-			320
	4	-	5	-	200	75			5,120
	5	75	850	-	-	-			2,560
<b>GMT</b>		25	5	-	-	-	<b>2,230</b>		
ChimeriVax™- WN04-d7	1	-	-	25	-	-	260	2.2	640
	2	-	-	525	-	-			1,280
	3	-	300	250	-	-			640
	4	-	400	125	-	-			640
	5	-	25	50	-	-			1,280
<b>GMT</b>		-	-	-	-	-	<b>840</b>		
ChimeriVax™- WN04-dB	1	-	325	75	-	-	355	2.2	2,560
	2	-	150	100	-	-			640
	3	-	-	875	-	-			1,280
	4	-	250	50	-	-			5,120
	5	-	175	-	-	-			2,560
<b>GMT</b>		-	-	-	-	-	<b>1,940</b>		
ChimeriVax™- WN04-dC <sup>4</sup>	1	-	-	-	-	-	15 (<25)	0.4	320
	2	-	-	-	-	-			1,280
	3	-	50	-	-	-			320
	4	-	25	-	-	-			1,280
	5	-	-	-	-	-			1,280
<b>GMT</b>		-	-	-	-	-	<b>735</b>		

ChimeriVax™- WN04-dD	1	-	-	150	-	-	145	2	2,560
	2	-	300	125	-	-			640
	3	-	-	-	-	-			80
	4	-	200	75	-	-			2,560
	5	-	75	75	-	-			1,280
<b>GMT</b>									<b>840</b>
ChimeriVax™- WN04-E#3	1	-	1,15				1,460	2.6	640
	2	-	0	100	-	-			2,560
	3	-	2,45	25	-	-			640
	4	-	0	75	-	-			2,560
	5	-	1,32	25	-	-			640
		-	5		-	-			2,560
		-	1,32		-	-			640
		-	5		-	-			2,560
		-	1,05		-	-			640
		-	0		-	-			640
<b>GMT</b>									<b>1,110</b>
ChimeriVax™- WN04-E#5	1	-	1,60				1,310	3	2,560
	2	150	0	-	-	-			2,560
	3	-	750	-	-	-			2,560
	4	50	1,92	-	-	-			5,120
	5	25	5	-	-	-			1,280
		-	1,65	225	-	-			320
		-	0	475	-	-			320
		-	625		-	-			320
<b>GMT</b>									<b>1,690</b>
ChimeriVax™- WN04-E#7	1	-	200	75	-	-	300	2.2	320
	2	-	325	150	-	-			80
	3	-	400	25	-	-			2,560
	4	-	525	-	-	-			640
	5	-	-	50	-	-			160
<b>GMT</b>									<b>370</b>
ChimeriVax™- WN04-E#6A	1	-	-	-	-	-	30	2	<10
	2	-	-	-	-	75			40
	2	-	-	75	-	25			80
<b>GMT</b>									<b>32</b>
ChimeriVax™- WN02 Large WN02 Grande Control de placas	1	-	2,42				2,285	2.2	5,120
	2	50	5	-	-	-			10,240
	3	-	2,57	-	-	-			5,120
	4	-	5	-	-	-			10,240
	5	-	2,92	-	-	-			5,120
		-	5	-	-	-			10,240
		-	1,85	175	-	-			5,120
		-	0		-	-			10,240
		75	1,65		-	-			5,120
			0		-	-			5,120
<b>GMT</b>									<b>6,760</b>
ChimeriVax™- WN02 Small WN02 Pequeño Control de placas	1	-	-	-	-	-	5	0.2	80
	2	-	-	-	-	-	(<25)		320
	3	-	-	-	-	-			40
	4	-	-	-	-	-			<10

	5	-	25	-	-	-	<10		
<b>GMT</b>							<b>16</b>		
YF-VAX	1			Hamster perdido	N/A	N/A	0	0	N/A
	2	-	-	-	-	-	(<25)		1,280
	3	-	-	-	-	-			5,120
	4	-	-	-	-	-			320
	5	-	-	-	-	-			10,240
<b>GMT</b>									<b>2,150</b>
Falso	1						N/A	N/A	<10
		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			<10
	5								<10
		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			<10
	3								<10
		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			<10
	4								<10
		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			<10
	5								<10
		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			<10

<sup>1</sup> Volúmenes de inoculación: 100 µl; dosis de inoculación: 5 log<sub>10</sub> pfu para los virus ChimeriVax™-WN04 y los controles LP y SP de WN02, y ~ 4 log<sub>10</sub> pfu para YF17D (YF-VAX); los animales falsamente inoculados recibieron 100 µl de medio de dilución (MEN, 50% FBS).

5 <sup>2</sup> Nivel de detección: 25 pfu/ml.

<sup>3</sup> Títulos de anticuerpos neutralizantes determinados por PRNT<sub>50</sub> el día 30 contra:

ChimeriVax™-WN02 para todos los grupos inoculados con las variantes ChimeriVax™-WN, o YF17D para el grupo YF-VAX, o ambas para el grupo inoculado falsamente.

10 <sup>4</sup> En un experimento separado con hámsters, se ensayó la muestra del Paso 5 (P5) del mutante dC, en la cual la delección aumentaba espontáneamente a 24 nucleótidos (véase el texto anterior). El virus se mantenía fuertemente atenuado (viremia pico media 25 pfu/ml, duración media 3,5 días) e inmunógeno (PRNT<sub>50</sub> GMT de 452 el día 33). Se ensayaron también los virus CS2d5 y CS2d16 P2 y se encontró que eran análogamente muy atenuados e inmunógenos (viremia pico media (pfu/ml)/duración media de viremia (días/PRNT<sub>50</sub> GMT el día 33 de 137/2.75/127 y 343/2.25/905, respectivamente).  
15 Todos los animales inmunizados con estas variantes de WN04 con inclusión de dC P5 estaban fuertemente protegidos, en contraste con el control de Placa Pequeña WN02, cuando se expusieron aproximadamente 10 meses después de la inmunización con WN de tipo salvaje.

El control ChimeriVax™-WN02 LP (variante de vacuna infra-atenuada) inducía viremia pico alta en 5 hámsters inoculados que iba desde 1.650 a 2.925 pfu/ml (valor medio 2.285 pfu/ml). Estos animales tenían los títulos máximos de anticuerpos neutralizantes de WN el día 30, comprendidos en el intervalo de 5.120-10.240 (GMT 6.760). El control de WN02 SP no inducía viremia detectable alguna en 4 de 5 animales; una viremia de bajo nivel detectada en un hámster el día 3 se encontraba en el límite de detección del ensayo, 25 pfu/ml). La respuesta de anticuerpos específicos de WN era muy baja en estos animales. La misma era indetectable en dos hámsters (título < 10); los otros 3 tenían títulos bajos de anticuerpos de 40-320. Es interesante que la inoculación con YF-VAX no daba como resultado viremia detectable alguna, sino una respuesta de anticuerpos neutralizantes específica de YF alta (320-10.240 títulos PRNT50; GMT 2150). Como era de esperar, los animales falsamente inoculados no tenían anticuerpo neutralizante alguno específico de WN o YF el día 30.

Para conseguir una reducción menor en el viscerotropismo para los primates se intentó, de ser posible, identificar en el modelo de hámster una serie de variantes ChimeriVax™-WN04 que causaran una gama de viremias que fuesen menores que la del virus LP, pero que indujeran al mismo tiempo una respuesta inmune mayor que el virus SP. De los 11 virus ChimeriVax™-WN04 ensayados, la mayoría parecían estar al menos algo atenuados in vivo comparados con el virus LP (Tabla 5) a juzgar por los niveles de viremia post-inoculación (los títulos de viremia pico máximos abarcaban desde < 25 a 1.460 pfu/ml). Entre las variantes menos atenuadas se encontraban el mutante de delección C1 de la proteína C, el mutante de delección dRS de 3'UTR, y las variantes de WN04-E #3 y #5. Estos virus inducían altas respuestas de anticuerpos neutralizantes GMT 1.110-2.560). Un virus, la variante #6A de WN04-E, estaba evidentemente super-atenuado como se evidenciaba a la vez por viremia muy baja y respuesta débil de anticuerpos. Indudablemente, la última variante puede excluirse de los tests ulteriores en monos/humanos. Los candidatos ChimeriVax™-WN04 que tenían características particularmente favorables son el mutante de delección C2 de la proteína de la cápsida, los mutantes de delección pequeños 3'UTR d7, dB, dC, y dD, y la variante E#7. Estos virus causaban una viremia moderada a fuertemente reducida en los hámsters (títulos de viremia pico media comprendidos en el intervalo de < 25-680 pfu/ml), lo que no excluía sin embargo una respuesta inmune fuerte (anticuerpo neutralizante GMT 370-2940).

Para demostrar la eficacia protectora, todos los animales se expusieron por vía intraperitoneal el día 62 después de la inmunización con  $4 \times 10^5$  pfu de virus WN virulento tipo salvaje (cepa NY 382/99). Todos los animales que tenían títulos altos de anticuerpos neutralizantes WN (el día 30), específicamente en los grupos WN04-C1, C2, dRS, d7, dB, dC, dD, E#3, E#5, E#7, y WN02 LP de control (véase en la Tabla 5), estaban completamente protegidos a juzgar por la ausencia de viremia post-enfrentamiento (medida en los sueros recogidos los días 1, 3, 5, 7 y 9), pérdida de peso, síntomas, o muerte. Al menos algunos de los animales en otros grupos, específicamente E#6A, WN02 SP de control, YF-VAX, e infectados falsos, que no tenían títulos de anticuerpos neutralizantes de WN altos, no estaban protegidos a juzgar por al menos uno de los parámetros arriba indicados. Se observaba una viremia alta los días 1-5 (título de viremia pico de hasta  $9,75 \times 10^5$  pfu/ml) en la totalidad de los animales YF-VAX e inmunizados falsos. La mayoría de estos animales estaban enfermos, perdían peso, y dos animales en el grupo YF-VAX murieron. Dos animales en el grupo E#6 y 1 animal en el grupo WN02 SP exhibían una viremia de nivel bajo los días 1-2.

Efectos de las mutaciones en las variantes ChimeriVax™-WN04 sobre el crecimiento de virus en células hepáticas

Para obtener evidencia adicional del viscerotropismo reducido resultante de las mutaciones WN04, se analizaron las cinéticas de crecimiento de algunas de las variantes de ChimeriVax™-WN04 más prometedoras (seleccionadas sobre la base de los datos arriba presentados, v.g. viremia baja e inmunogenicidad alta en hámsters; véase en la Tabla 5) en la línea de células de hepatoma humano HepG2. Dado que el virus YF es un virus hepatotrópico, se esperaba apreciar una reducción en la replicación de las variantes WN04 comparada con el virus ChimeriVax™-WN02 LP (vacuna infraatenuada). Se infectaron monocapas de células HepG2 a una MOI de 0,005 pfu/ml, se cosecharon diariamente partes alícuotas de sobrenadantes que contenían el virus (hasta el día 10), y se determinaron luego los títulos de virus por ensayo de placas en células Vero. Las variantes WN04 atenuadas incluidas en este experimento eran los mutantes de delección 3'UTR d7, dB, dC, y dD, el mutante C2 de delección de la proteína de la cápsida (así como el mutante C1 menos atenuado como control adicional), y el mutante E#7 de la proteína de la envoltura. Excepto en lo que respecta al mutante C1, todos los virus WN04 restantes se replicaban menos eficientemente en comparación con el virus WN02 LP (Fig. 5), pero la mayoría de ellos (con la excepción de dD) crecían mejor que la variante WN02 SP, que se supone es una variante de vacuna superatenuada para humanos. Esto indicaba que algunas mutaciones de WN04 pueden reducir el hepatotropismo de la vacuna en humanos, que es una característica muy deseable. Este experimento demuestra adicionalmente los beneficios de los candidatos para E#7, d7, dC, y dD que exhiben la reducción más clara en replicación comparados con WN02 LP, siendo quizás el mutante dD el menos hepatotrópico.

Mutantes dobles ChimeriVax™-WN04; análisis de viscerotropismo e inmunogenicidad en los hámsters

La combinación de tipos diferentes de mutaciones atenuantes debería dar como resultado una atenuación adicional y un fenotipo de vacuna más fiable, menos probable de sufrir retrogradación a patogenicidad. A este fin, se produjeron cuatro variantes ChimeriVax™-WN04 mutantes dobles, en las cuales la delección C2 estaba combinada con delecciones 3'UTR d7, dB, o dD, o la combinación de mutaciones E#5 en la proteína de la envoltura (cambios específicos adicionales E176, 177, y 280 SA14-14-2). Se obtuvieron moldes de DNA para transcripción in vitro por ligación estándar de dos o tres fragmentos utilizando porciones apropiadas de los plásmidos 5'3' y 5,2 construidos previamente para mutantes simples de WN04. Éstos se transcribieron con RNA-polimerasa SP6 y los virus se recuperaron después de electroporación de células Vero con los transcritos de RNA. Los virus P2 se titularon en células Vero. La totalidad de los 4 mutantes dobles parecían fuertemente atenuados en cultivo de células, dado que producían placas diminutas, más pequeñas que las de los controles LP y SP de WN02. El mutante C2+E5 tenía un título elevado de  $1,3 \times 10^7$  pfu/ml, mientras que los otros tres virus (C2+d7, C2+dB, y C2+dD) tenían títulos intermedios de  $4,2-6,1 \times 10^5$  pfu/ml (Tabla 6).

Tabla 6. Características in vitro de los mutantes dobles ChimeriVax™-WN04

Virus	Título de P2, pfu/ml	Morfología de Placa el día 5
C2+E5 P2	$1,3 \times 10^7$	diminuta (mediano ~ 0,5 mm)
C2+d7P2	$4,2 \times 10^5$	diminuta
C2+dB P2	$6,1 \times 10^5$	diminuta
C2+dD P2	$6,1 \times 10^5$	diminuta
WN02LP control	$9 \times 10^6$	grande/pequeña, transparente
WN02SP control	$5,8 \times 10^7$	pequeña, transparente

Para evaluar la atenuación y la inmunogenicidad, se inocularon hámsters Sirios hembra de 4 semanas de edad por vía subcutánea (SC) con  $5 \log_{10}$  pfu de los mutantes dobles, así como los virus de control LP y SP de WN02, o diluyente (infectados falsos). Se midió la viremia los días 1-10 y se determinaron las respuestas de anticuerpos el día 35 por PRNT<sub>50</sub>. Los resultados se muestran en la Tabla 7. Los cuatro mutantes dobles eran competentes en replicación, causando viremia detectable de nivel bajo en la mayoría de los animales, excepto en lo que respecta a C2+d7, para el cual se detectó viremia únicamente en un animal. Estos virus eran significativamente más atenuados en comparación con el virus WN02 LP (viremia pico media ~ 7.000 pfu/ml), y parecían más atenuados comparados con los mutantes simples correspondientes (v.g., compárense los títulos de viremia pico media con los de la Tabla 5). Aunque no se detectaba viremia en todos los animales, todos los hámsters desarrollaban respuesta de alto nivel de anticuerpos neutralizantes. Los valores PRNT<sub>50</sub> GMT para C2+E5, C2+d7, C2+ y C2+dD eran 1:640, 1:840, 1:1.280, y 1:640, respectivamente.

Tabla 7. Viremia y respuestas de anticuerpos a variantes mutantes dobles ChimeriVax™-WN04 después de inoculación SC de hámsters Sirios hembra.

Virus <sup>1</sup>	Hámster #	Título de viremia (pfu/ml) en los días <sup>1</sup>							Título de viremia pico medio	Duración de viremia media (días)	PRNT <sub>50</sub>	
		d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7			(el día 35)	día
C2+E5 P2	1	-	-	-	600	1,300	800	1,850	810	3.0	640	
	2	50	-	-	-	50	600	1,200			640	
	3	-	-	-	50	50	-	-			640	
	4	50	-	500	200	-	-	-			1,280	
	5	-	-	-	450	50	-	-			320	
<b>GMT</b>											<b>640</b>	
C2+d7 P2	1	-	-	50	-	-	-	-	10	0.2	>1,280	
	2	-	-	-	-	-	-	-			640	
	3	-	-	-	-	-	-	-			320	
	4	-	-	-	-	-	-	-			1,280	
	5	-	-	-	-	-	-	-			1,280	
<b>GMT</b>											<b>840</b>	
C2+dB P2	1	-	-	-	-	-	-	-	230	1.6	>1,280	
	2	-	-	200	50	-	-	-			1,280	
	3	-	-	200	300	-	-	-			1,280	
	4	-	-	50	600	50	-	-			>1,280	
	5	-	-	50	-	-	-	-			1,280	
<b>GMT</b>											<b>1,280</b>	
C2+dD P2	1	-	-	-	-	-	-	-	80	1.0	1,280	
	2	-	100	250	-	-	-	-			1,280	
	3	-	50	-	-	-	-	-			>1,280	
	4	-	50	-	-	-	-	-			>1,280	
	5	-	50	-	-	-	-	-			160	
<b>GMT</b>											<b>640</b>	
WN02 SP	1	-	50	-	-	-	-	-	10	0.2	320	
	2	-	-	-	-	-	-	-			320	
	3	-	-	-	-	-	-	-			40	
	4	-	-	-	-	-	-	-			320	
	5	-	-	-	-	-	-	-			40	
<b>GMT</b>											<b>140</b>	
WN02 LP	1	-	700	3,750	1,350	-	-	-	7,070	3.6	>320	
	2	2,450	20,000	7,600	50	-	-	-			>640	
	3	-	50	550	5,800	3,400	-	-			>320	
	4	-	400	2,050	2,900	-	-	-			>640	
	5	-	200	450	2,900	150	-	-			>640	
<b>GMT</b>											<b>&gt;485<sup>2</sup></b>	

<sup>1</sup>Límite de detección de viremia 50 pfu/ml; se ensayaron también los días 8-10, sin que se detectara viremia.

<sup>2</sup>Dado que la dilución de suero que produjera 50% de neutralización no se alcanzó en todos los animales, este valor puede ser significativamente mayor que el indicado.

Para demostrar la protección, los animales se expusieron por vía intraperitoneal el día 36 a un virus WN tipo salvaje altamente letal, la cepa NY385/99, que es más patógena que NY382/99, utilizada en los experimentos anteriores, a

5  $2 \times 10^5$  pfu/dosis. Los animales inmunizados con mutantes dobles WN04, así como el control LP de WN02, estaban totalmente protegidos, dado que no existía viremia post-exposición (medida los días 2, 4 y 6), ni pérdida alguna de peso que fuera indicativa de enfermedad. En contraste, los animales SP WN02 y los animales de control falsamente inmunizados no estaban protegidos. Estos animales desarrollaban viremia (títulos pico de 250-3.000 y  $>2.000$  pfu/ml para los animales SP WN02 y falsos, respectivamente), presentaban síntomas de enfermedad, y perdían peso. Uno de 5 y 4 de 5 animales en los grupos SP de WN02 y falsos, respectivamente, murieron. Dos animales supervivientes en el grupo SP de WN02 y 1 animal superviviente en el grupo falso quedaron paralíticos).

10 Así pues, los inventores han generado con éxito múltiples candidatos ChimeriVax™-WN04 que están más atenuadas en comparación con la vacuna ChimeriVax™-WN02 previa, pero no excesivamente atenuadas, utilizando modificaciones exclusivas de tres métodos diferentes para atenuación de flavivirus, e introducción de diferentes tipos de mutaciones atenuantes aisladas o en combinaciones.

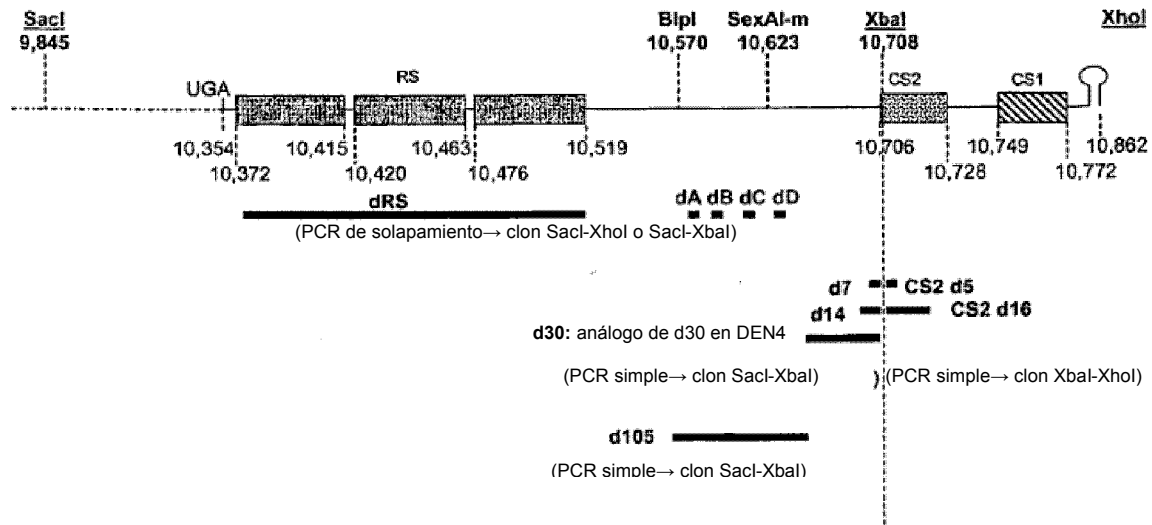


**REIVINDICACIONES**

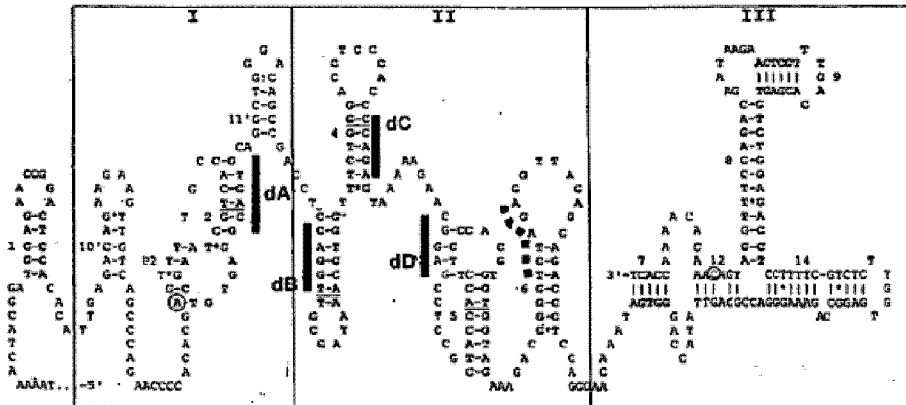
- 5 1. Un flavivirus quimérico que comprende un virus de la fiebre amarilla de la cepa YF17D en el cual las proteínas de la membrana y de la envoltura del virus de la fiebre amarilla están reemplazadas por las proteínas de la membrana y de la envoltura de la cepa NY99 del virus del Nilo Occidental, en donde dicho flavivirus quimérico comprende las mutaciones siguientes:
- (a) las sustituciones L107F, A316V y K440R en la proteína de la envoltura;
- (b) la deleción C2 (deleción de los aminoácidos PSR, residuos 40-42) en la proteína de la cápsida; y
- adicionalmente, o bien:
- 10 (c)(i) una deleción en la región 3' no traducida (3'UTR) del genoma de flavivirus quimérico seleccionada de: dB (deleción de CAGGT, nucleótidos 256-260), dD (deleción de CGGAG, nucleótidos 308-312) y d7 (deleción de AAGACGG, nucleótidos 345-351); o
- (c)(ii) las sustituciones Y176V, T177A y K280M en la proteína de la envoltura.
2. Un flavivirus quimérico según la reivindicación 1, que comprende la deleción dB en la 3'UTR (deleción de CAGGT, nucleótidos 256-260).
- 15 3. Un flavivirus quimérico según la reivindicación 1, que comprende la deleción dD en la 3'UTR (deleción de CGGAG, nucleótidos 308-312).
4. Un flavivirus quimérico según la reivindicación 1, que comprende la deleción d7 en la 3'UTR (deleción de AAGACGG, nucleótidos 345-351).
- 20 5. Un flavivirus quimérico según la reivindicación 1, que comprende las sustituciones Y176V, T177A y K280M en la proteína de la envoltura.
6. Una composición farmacéutica que comprende el flavivirus quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
7. Una composición farmacéutica según la reivindicación 6 para uso en un método para prevención o tratamiento de una infección de flavivirus en un individuo.
- 25 8. Una composición farmacéutica según la reivindicación 6 para uso según la reivindicación 7, en donde la infección de flavivirus es una infección del virus del Nilo Occidental.
9. Una molécula de ácido nucleico que comprende el genoma del flavivirus quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

Fig. 1. Delecciones en las 3'UTRs de los candidatos ChimeriVax™-WN04-3'UTR. Panel A: Organización de las 3'UTR y delecciones introducidas. Panel B: estructuras tallo-bucle predichas (Proutski et al., J. Gen. Virol. 78: 1543-1549, 1999), con inclusión de las que se desestabilizarán por pequeñas delecciones dA-dD. Paneles C y Fig. 1.D, predicciones de las estructuras 3'UTR de YF17D y el mutante dC, respectivamente, por el algoritmo de Zuker; y Panel E, predicción de la estructura para el virus dC P5 que contiene la delección aumentada de 24 nucleótidos.

A.



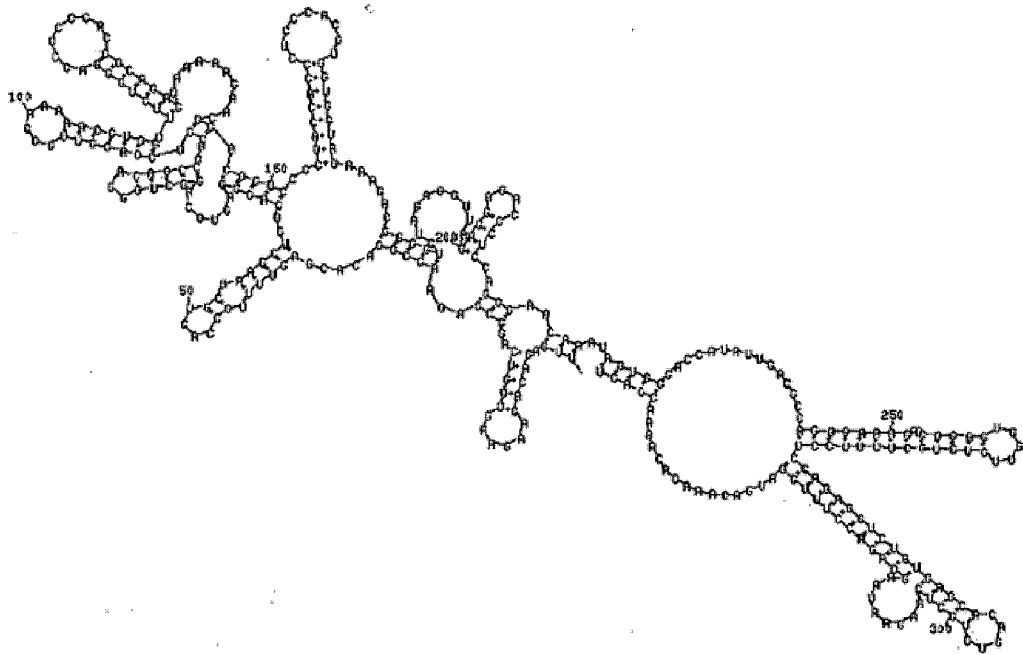
B.



Nota: La línea de puntos en 2B designa el sitio de restricción en el nucleótido 10.708.

Fig.1. ... (continuación)

C.

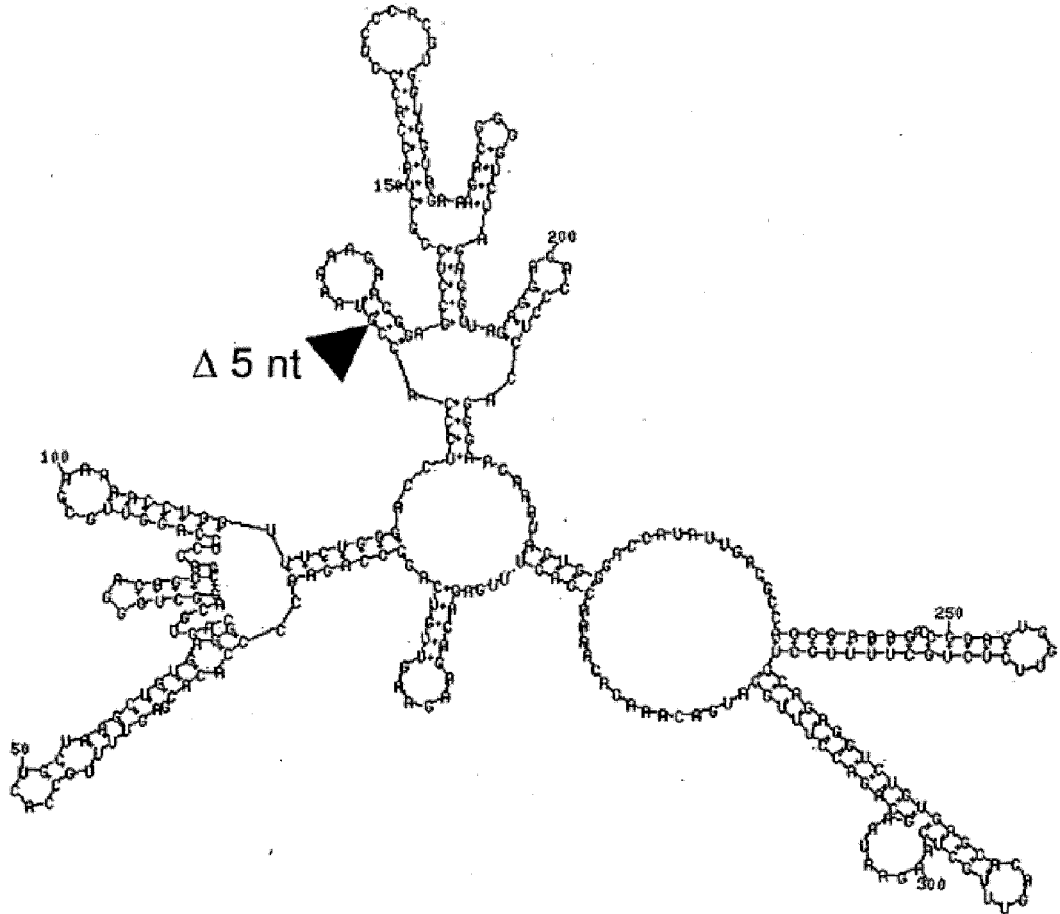


$dG = -104,5$  [inicialmente -121,1]

05Jun06-12-25-44

Fig.1. ... (continuación)

D.

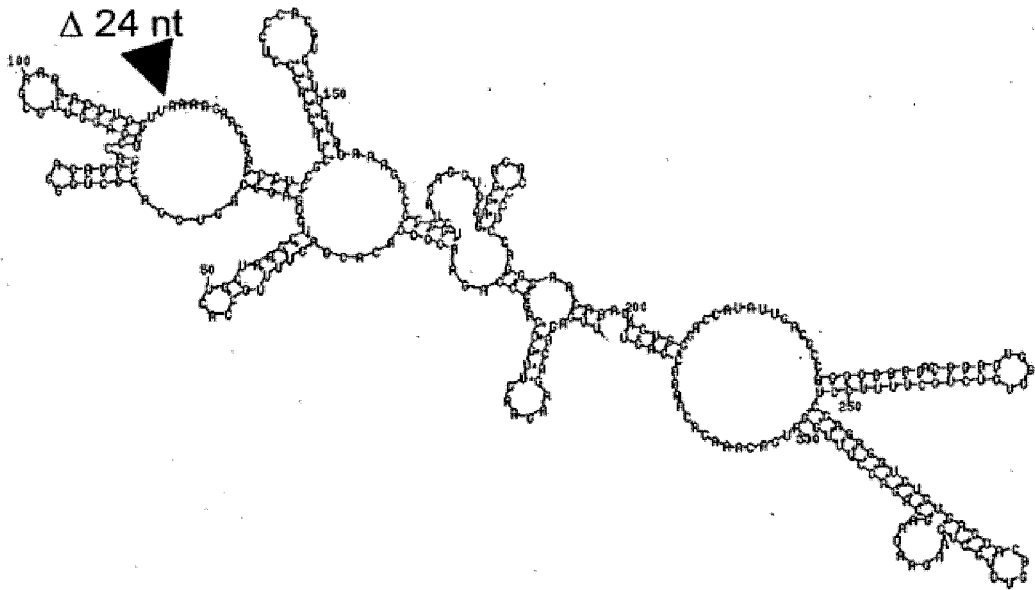


dG = -114,22 [inicialmente -120,5]

dC

Fig.1. ... (continuación)

E.



dG = -96,57 [inicialmente -110,6]

dC P5 24 nt

Fig. 2. Diseño de las deleciones atenuantes para las variantes ChimeriVax™-WN04-C. Panel A: deleciones descritas previamente introducidas en la proteína C del virus TBE (Kofler et al., J. Virol. 76, 3534-3543, 2002). Panel B: estructura predicha por computadora de la proteína C específica de YF 17D, y deleciones propuestas C1-C5 (encuadradas) a introducir en ChimeriVax™-WN02.

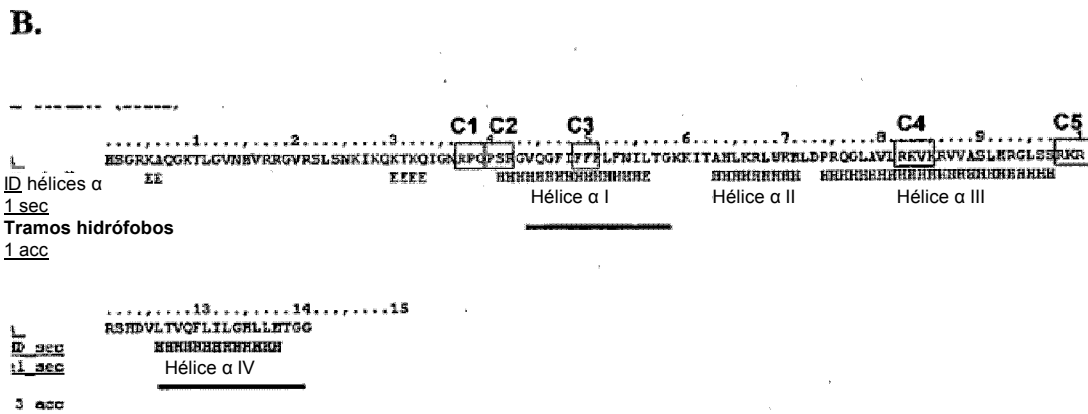
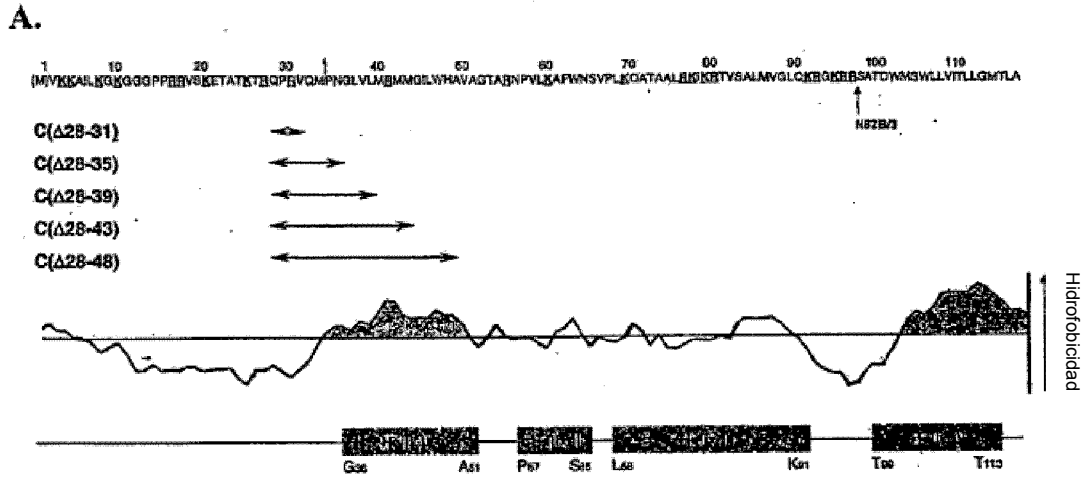


Fig. 3. Modelo de homología del dímero de la proteína YF 17D basado en la estructura del virus 2 del dengue (Modis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100:6986-6991, 2003). Ocho residuos de aminoácido diferencian Asibi tipo salvaje del virus de la vacuna 17D. Se muestran primero siete tipos de residuos de aminoácido en el virus Asibi parental, seguidos por el tipo de residuo del virus 17D0. El residuo A407V no está dentro de la estructura cristalina conocida, por lo que no se muestra aquí. Los aminoácidos se muestran por la representación CPK (presenta esferas dimensionadas para los radios van der Waals (VDW)).

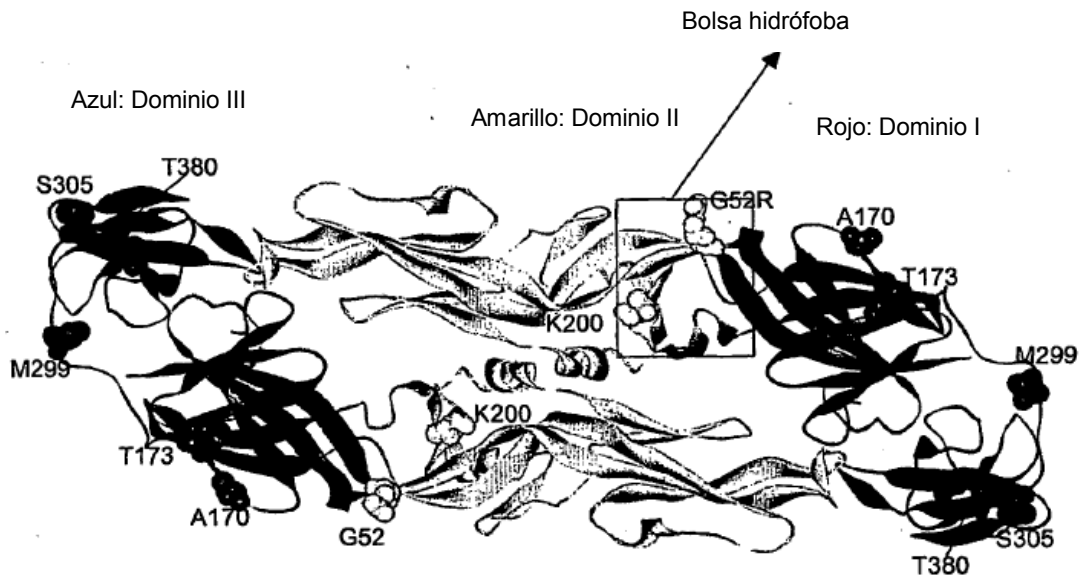


Fig. 4. Plásmidos de ChimeriVax™-WN que contienen las mutaciones específicas de SA14-14-2 en la proteína E de la envoltura (y M66 en la proteína M).

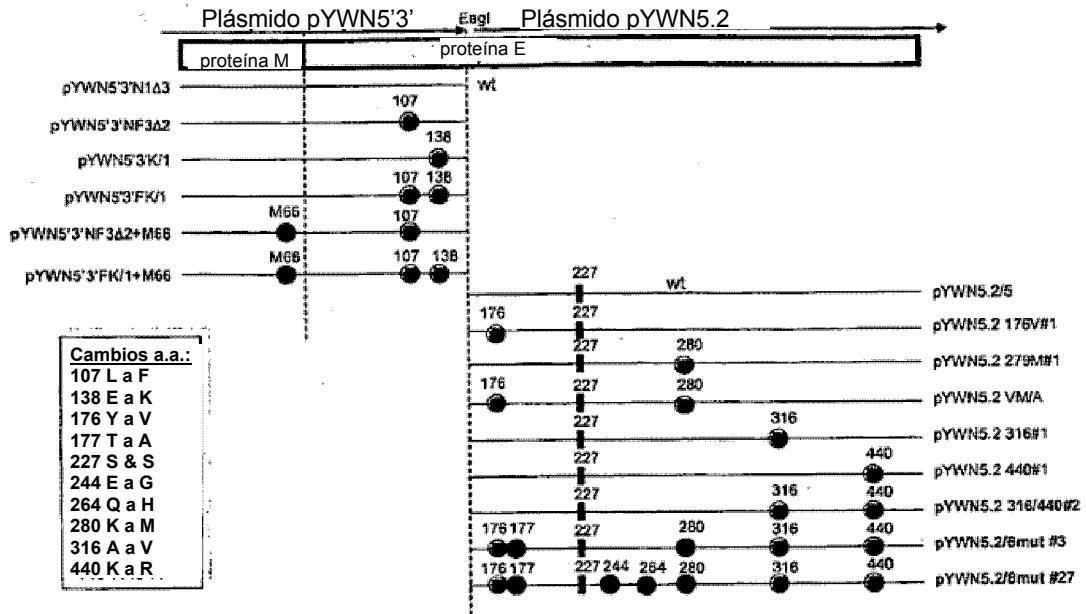




Fig. 5. Efectos de las deleciones en la proteína de la cápsida (C1 y C2) y 3'UTR (d7, dB, dC, y dD), o cambios de aminoácidos en la proteína de la envoltura (E#7) sobre la replicación de variantes de ChimeriVax™-WN04 en las células HepG2, en comparación con WN02 LP (virus infraatenuado) y WN02 SP.

