

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 585 553**

51 Int. Cl.:

C07H 21/04 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.08.2007** **E 12182319 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2016** **EP 2589602**

54 Título: **Desarrollo de componentes de vacunas del virus del dengue**

30 Prioridad:

15.08.2006 US 837723 P

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

06.10.2016

73 Titular/es:

**THE GOVERNMENT OF THE U.S.A., AS REPR. BY
THE SECRETARY, DEPT. OF HEALTH & HUMAN
SERVICES, THE NAT. INST. OF HEALTH (100.0%)
Office of Technology Transfer, Suite 325, 6011
Executive Blvd.
Rockville, MD 20852-3804, US**

72 Inventor/es:

**WHITEHEAD, STEPHEN S.;
BLANEY, JOSEPH E.;
MURPHY, BRIAN R. y
LAI, CHING-JUH**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 585 553 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

Desarrollo de componentes de vacunas del virus del dengue

5 Campo de la invención

La divulgación se refiere a mutaciones en la región no traducida 3' del genoma de los serotipos 1, 2, 3 y 4 del virus del dengue, que son útiles en la atenuación de las características de crecimiento de las vacunas del virus del dengue.

10 Descripción de la técnica relacionada

Hay cuatro serotipos del virus del dengue (virus del dengue de tipo 1 [DEN1], DEN2, DEN3 y DEN4) que anualmente causan un cálculo estimado de 50 a 100 millones de casos de fiebre del dengue y 500.000 casos en la forma más grave de la infección por el virus del dengue conocida como fiebre hemorrágica del dengue/síndrome de choque por dengue (Gubler, D. J. y M. Meltzer 1999 Adv Virus Res 53:35-70). El virus del dengue está ampliamente distribuido en todas las regiones tropicales y semitropicales del mundo, y el número de infecciones por el virus del dengue continúa aumentando debido al amplio alcance de su vector, el mosquito *Aedes aegypti*. Para el control de la enfermedad del dengue no se dispone de vacunas a pesar de su importancia como una enfermedad resurgente. El objetivo de la inmunización es proteger contra la enfermedad del virus del dengue mediante la inducción de una respuesta de anticuerpo neutralizante de larga duración contra cada uno de los cuatro serotipos. Se requiere la protección simultánea contra los cuatro serotipos, ya que en personas con anticuerpos preexistentes contra un virus del dengue heterotípico, puede producirse un aumento en la gravedad de la enfermedad. Dicha inmunización puede realizarse de manera asequible con una vacuna del virus viva, atenuada.

25 Los virus del dengue son virus de ARN de sentido positivo que pertenecen al género *Flavivirus*. El genoma de aproximadamente 11.000 bases contiene una sola fase de lectura abierta que codifica una poliproteína que se procesa por proteasas de origen tanto vírico como celular en tres proteínas estructurales (C, prM, y E) y al menos siete proteínas no estructurales (NS). Ambos extremos del genoma del virus del dengue contienen una región no traducida (UTR, *untranslated región*) y la organización genómica general es 5'-UTR-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-UTR-3'. La UTR 3' tiene una longitud de apenas 400 bases y se prevé que contenga diversas estructuras en tallo-bucle conservadas entre los serotipos del virus del dengue (Brinton, M. A. *et al.* 1986 Virology 153:113-121, Hahn, C. S. *et al.* 1987 J Mol Biol 198:33-41, Proutski, V. *et al.* 1997 Nucleic Acids Res 25:1194-1202, Rauscher, S. *et al.* 1997 RNA 3:779-791, Shurtleff, A. *et al.* 2001 Virology 281:75-87). Una estructura en tallo-bucle de este tipo, identificada como TL-2 en la estructura secundaria propuesta de la UTR 3' (Proutski, V. *et al.* 1997 Nucleic Acids Res 25:1194-1202), se retiró previamente por delección de 30 nucleótidos del genoma de DEN4 (nucleótidos 172 a 143 en 3') (Men, R. *et al.* 1996 J Virol 70:3930-3937) y posteriormente se designó como mutación $\Delta 30$ (Durbin, A. P. *et al.* 2001 Am J Trop Med Hyg 65:405-413). Se mostró que el virus resultante, rDEN4 $\Delta 30$, estaba atenuado en monos rhesus en comparación con los virus parentales que contenían una secuencia TL-2 intacta y que estaba atenuado en seres humanos (Durbin, A. P. *et al.* 2001 Am J Trop Med Hyg 65:405-413).

Sumario de la invención

45 La divulgación se refiere a un virus del dengue o a un virus del dengue quimérico que comprende una mutación en la región no traducida 3' (UTR-3') seleccionada del grupo que consiste en:

50 (a) una mutación $\Delta 30$ que retira la estructura homóloga TL-2 en cada uno de los serotipos 1, 2, 3 y 4 del virus del dengue, y nucleótidos adicionales en la mutación $\Delta 30$ delecionada de la UTR-3' que retira la secuencia en la dirección 5' hasta el límite 5' de la estructura homóloga TL-3 en cada uno de los serotipos 1, 2, 3 y 4 del virus del dengue; y
(b) un reemplazo de la UTR-3' de un virus del dengue de un primer serotipo con la UTR-3' de un virus del dengue de un segundo serotipo, conteniendo opcionalmente la mutación $\Delta 30$ y nucleótidos adicionales en la mutación $\Delta 30$ delecionados de la UTR-3';

55 y composiciones inmunogénicas, métodos de inducción de una respuesta inmunitaria y métodos de producción de un virus del dengue o un virus del dengue quimérico.

Breve descripción de los dibujos

60 Figura 1. Dos estrategias para atenuar virus del dengue. A) (a-c) Delección de nucleótidos adicionales de la UTR-3' (cepa Sleman/78 de DEN3 de tipo silvestre (ts), SEQ ID NO: 1). B) Reemplazo de la UTR-3' de un virus del dengue de un primer serotipo con la UTR-3' de un virus del dengue de un segundo serotipo.

Figuras 2 - 5. Estructura secundaria prevista de la región TL-1, TL-2 y TL-3 de la UTR-3' de cada serotipo DEN. Se indica el número de registro del GenBank de la secuencia usada para la construcción de cada modelo de estructura secundaria. Únicamente se usaron los últimos 278, 281, 276 y 281 nucleótidos de DEN1, DEN2, DEN3 y DEN4, respectivamente, que comprendían la TL-1, TL-2 y TL-3, para impedir la circularización de la estructura y posterior plegamiento erróneo de elementos estructurales conocidos y experimentalmente verificados. En cada modelo

estructural se indican limitaciones específicas del programa mfold. Los nucleótidos que limitan con las deleciones principales se rodean con un círculo y se numeran, comenzando la numeración de los nucleótidos en el extremo del genoma 3' (sistema de numeración inversa). Figura 2 - SEQ ID NO: 2; Figura 3 - SEQ ID NO: 3; Figura 4 - SEQ ID NO: 4; Figura 5 - SEQ ID NO: 5.

5 Figuras 6 - 9. Mutación por deleción $\Delta 30$ representada para cada uno de los serotipos DEN1, DEN2, DEN3 y DEN4 del virus del dengue. La mutación $\Delta 30$ deleciona los nt 174 a 145 de DEN1, los nt 173 a 144 de DEN 2, los nt 173 a 143 de DEN3 y los nt 172 a 143 de DEN4, con el sistema de numeración inversa. La dirección delecionada se indica mediante el símbolo Δ . Figura 6 - SEQ ID NO: 6; Figura 7 - SEQ ID NO: 7; Figura 8 - SEQ ID NO: 8; Figura 9 - SEQ ID NO: 9.

10 Figuras 10 - 13. Mutación por deleción $\Delta 30/31$ representada para cada uno de los serotipos DEN1, DEN2, DEN3 y DEN4 del virus del dengue. Además de la deleción de los nucleótidos que comprenden la mutación $\Delta 30$, la mutación $\Delta 31$ deleciona los nt 258 a 228 de DEN1, DEN2, DEN3, y DEN4, con el sistema de numeración inversa. La región delecionada se indica con el símbolo Δ . Figura 10 - SEQ ID NO: 10; Figura 11 - SEQ ID NO: 11; Figura 12 - SEQ ID NO: 12; Figura 13 - SEQ ID NO: 13.

15 Figuras 14 - 17. Mutación por deleción $\Delta 86$ representada para cada uno de los serotipos DEN1, DEN2, DEN3 y DEN4 del virus del dengue. La mutación $\Delta 86$ deleciona los nt 228 a 145 de DEN1, los nt 228 a 144 de DEN 2, los nt 228 a 143 de DEN3 y los nt 228 a 143 de DEN4, con sistema de numeración inversa. La región delecionada se indica con el símbolo Δ . Figura 14 - SEQ ID NO: 14; Figura 15 - SEQ ID NO: 15; Figura 16 - SEQ ID NO: 16; Figura 17 - SEQ ID NO: 17.

20 Figura 18. Quimerización de rDEN3 con la UTR-3' de rDEN4 o de rDEN4 $\Delta 30$. A) Se construyeron virus del dengue quiméricos UTR-3' recombinantes reemplazando la UTR-3' de rDEN3 con regiones procedentes de rDEN4 o rDEN4 $\Delta 30$. La localización relativa de la mutación $\Delta 30$ en la UTR-3' se indica con una flecha. Las uniones entre la fase de lectura abierta, ORF, y la región no traducida, UTR, para rDEN3 y rDEN4 se indican como uniones 1 y 2, respectivamente. También se indica la unión intertípica 3 para los virus quiméricos resultantes. B) Se muestran las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de las regiones de unión. Para la unión 3, las sustituciones de nucleótidos usadas para introducir un único sitio de reconocimiento de la enzima de restricción *HpaI* se muestran en minúscula. Unión 1 - SEQ ID NO: 18 (nucleótidos) y 19 (aminoácidos); Unión 2 - SEQ ID NO: 20 (nucleótidos) y 21 (aminoácidos); Unión 3 - SEQ ID NO: 22 (nucleótidos) y 23 (aminoácidos).

25 Figura 19. Replicación en células Vero y en células C6/36. Se compararon cuatro virus mutantes con rDEN3 de tipo silvestre (ts) para la replicación en células Vero y en células C6/36. Se infectaron matraces de 75 cm² de células confluentes a una multiplicidad de infección de 0,01. Se retiraron partes alícuotas de 0,5 ml de los matraces diariamente durante siete días. Después de la adición de SPG a una concentración de 1X, las muestras se congelaron en hielo seco y se conservaron a -80 °C. El título de los virus se determinó mediante ensayo en placa en células Vero para todas las muestras. El límite de detección es de 1,0 log₁₀UFP/ml.

35 Descripción detallada de la realización preferida

Definiciones

40 A menos que se defina de otra manera, los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el normalmente entendido por un experto habitual en la técnica a la cual pertenece está invención. Véase, por ejemplo, Singleton P y Sainsbury D., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 3^a ed., J. Wiley & Sons, Chichester, Nueva York, 2001, y Fields Virology 4^a ed., Knipe D.M. y Howley P.M. eds, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia 2001.

45 El término "aproximadamente" significa entre 1, 2 o 3 nucleótidos.

Virus del dengue mutantes y virus del dengue quiméricos

50 Un objetivo de la divulgación es desarrollar un conjunto de componentes de vacuna del dengue atenuada, viva, específica de tipo, que pueda formularse en una vacuna del dengue tetravalente, segura, eficaz y asequible. La mutación $\Delta 30$ atenúa el serotipo DEN4 en monos rhesus (Men, R. *et al.* 1996 J Virol 70:3930-3937)). La mutación $\Delta 30$ retira una estructura homóloga (TL-2) en cada uno de los serotipos 1, 2, 3 y 4 del virus del dengue (Figura 2 - 5). Sin embargo, se descubrió que la mutación $\Delta 30$ no atenúa el serotipo DEN3 en monos rhesus.

55 Una realización proporciona virus del dengue y virus del dengue quiméricos que tienen una o más mutaciones que dan como resultado la atenuación, métodos de preparación de dichos virus del dengue y métodos para usar estos virus del dengue para prevenir o tratar infecciones causadas por virus del dengue. La mutación (o mutaciones) en el virus del dengue de la invención está presente en la región no traducida 3' (UTR-3') formada por los aproximadamente 384 nucleótidos más aguas abajo del ARN vírico, que se ha mostrado que desempeñan una función en la determinación de la atenuación. Los virus y métodos de la invención se describen adicionalmente de la siguiente manera.

60 Un ejemplo de un virus del dengue que puede usarse en la invención es la cepa Sleman/78 del serotipo 3. La aplicabilidad de la invención a todos los miembros del grupo taxonómico del virus del dengue se deduce por la observación de que las propiedades de otras cepas del virus del dengue son similares a las de una cualquiera de las cepas del virus del dengue. Los virus del dengue se han agrupado en cuatro serotipos (DEN1, DEN2, DEN3 y DEN4).

ES 2 585 553 T3

Se han identificado numerosas cepas para cada uno de los cuatro serotipos. Las secuencias genómicas completas de diversas cepas del virus del dengue se proporcionan como números de registro del Genbank en la Tabla A.

Tabla A. Ejemplos de cepas del virus del dengue

Serotipo	Cepa	N.º de Registro
1	02-20	AB178040
1	16007	AF180817
1	16007 PDK-13	AF180818
1	259par00	AF514883
1	280par00	A514878
1	293arg00	AY206457
1	295arg00	AF514885
1	297arg00	AF514889
1	301arg00	AF514876
1	98901518	AB189120
1	98901530	AB189121
1	A88	AB074761
1	Abiyán	AF298807
1	ARG0028	AY277665
1	ARG0048	AY277666
1	ARG9920	AY277664
1	BR-90	AF226685
1	BR-01-MR	AF513110
1	BR-97-111	AF311956
1	BR-97-233	AF311958
1	BR-97-409	AF311957
1	Camboya	AF309641
1	FGA-89	AF226687
1	FGA-NA d1d	AF226686
1	Fj231-04	DQ193572
1	GD05-99	AY376738
1	GD23-95	AY373427
1	GZ-80	AF350498
1	D1-hu-Yap-NIID27-2004	AB204803
1	D1-H-IMTSSA-98-606	AF298808
1	Mochizuki	AB074760
1	D1.Myanmar.059-01	AY708047
1	D1.Myanmar.194-01	AY713474
1	D1. Myanmar.206-01	AY713475
1	D1.Myanmar.23819-96	AY722802

ES 2 585 553 T3

Serotipo	Cepa	N.º de Registro
1	D1.Myanmar.305-01	AY713476
1	D1.Myanmar.31459-98	AY726555
1	D1.Myanmar.31987-98	AY726554
1	D1.Myanmar.32514-98	AY722803
1	D1.Myanmar.37726-01	AY726549
1	D1.Myanmar.38862-01	AY726550
1	D1.Myanmar.40553-71	AY713473
1	D1.Myanmar.40568-76	AY722801
1	D1.Myanmar.44168-01	AY726551
1	D1.Myanmar.44988-02	AY726552
1	D1.Myanmar.49440-02	AY726553
1	rPacífico Occidental-deltΔ30	AY145123
1	Pacífico Occidental rDENImutF	AY145122
1	S275-90	A75711
1	D1-hu-Seychelles-NND41-2003	AB195673
1	Singapur 8114-93	AY762084
1	Singapur S275-90	M87512
1	ThD1_0008_81	AY732483
1	ThD1_0049_01	AY732482
1	ThD1_0081_82	AY732481
1	ThD1_0097_94	AY732480
1	ThD1_0102_01	AY732479
1	ThD1_0323_91	AY732478
1	ThD1_0336_91	AY732477
1	ThD1_0442_80	AY732476
1	ThD1_0488_94	AY732475
1	ThD1_0673_80	A732474
1	Pacífico Occidental Recombinante	A145121
1	Isla Nauru del Pacífico Occidental 45AZ5	NC 001477
1	Isla Nauru del Pacífico Occidental Bethesda	U88535
1	Isla Nauru del Pacífico Occidental 45AZ5-PDK27	U88537
2	131	AF100469
2	16681-PDK53	M84728
2	16681 Blok	M84727
2	16681 Kinney	U87411
2	43	AF204178
2	44	AF204177

ES 2 585 553 T3

Serotipo	Cepa	N.º de Registro
2	98900663	AB189122
2	98900665	AB189123
2	98900666	AB189124
2	BA05i	AY858035
2	Bangkok 1974	AJ487271
2	BR64022	AF489932
2	C0166	AF100463
2	C0167	AF100464
2	C0371	AF100461
2	C0390	AF100462
2	China 04	AF119661
2	Cuba115-97	AY702036
2	Cuba13-97	AY702034
2	Cuba165-97	AY702038
2	Cuba205-97	AY702039
2	Cuba58-97	AY702035
2	Cuba89-97	AY702037
2	DR23-01	AB122020
2	DR31-01	A122021
2	DR59-01	AB122022
2	FJ-10	AF276619
2	FJ11-99	AF359579
2	I348600	AY702040
2	IQT1797	AF100467
2	IQT2913	AF100468
2	Jamaica-N.1409	M20558
2	K0008	A100459
2	K0010	AF100460
2	Mara4	AF100466
2	DEN2-H-IMTSSA-MART-98-703	AF208496
2	Nueva Guinea C	AF038403
2	Nueva Guinea C-PUO-218 híbrido	AF038402
2	Nueva Guinea-C	M29095
2	PDK-53	U87412
2	Vacuna S1	NC 001474
2	TB16i	AY858036
2	ThD2_0017_98	DQ181799
2	ThD2_0026_88	DQ181802

ES 2 585 553 T3

Serotipo	Cepa	N.º de Registro
2	ThD2_0038_74	DQ181806
2	ThD2_0055_99	DQ181798
2	ThD2_0078_01	DQ181797
2	ThD2_0168_79	DQ181805
2	ThD2_0263_95	DQ181800
2	ThD2_0284_90	DQ181801
2	ThD2_0433_85	DQ181803
2	ThD2_0498_84	DQ181804
2	ThNH-28-93	AF022435
2	ThNH29-93	AF169678
2	ThNH36-93	AF169679
2	ThNH45-93	AF169680
2	ThNH-52-93	AF022436
2	ThNH54-93	AF169682
2	ThNH55-93	AF169681
2	ThNH62-93	AF169683
2	ThNH63-93	AF169684
2	ThNH69-93	AF169685
2	ThNH73-93	AF169686
2	ThNH76-93	AF169687
2	ThNH81-93	AF169688
2	ThNH-p36-93	AF022441
2	ThNH-7-93	AF022434
2	ThNH-p11-93	AF022437
2	ThNH-p12-93	AF022438
2	ThNH-p14-93	AF022439
2	ThNH-p16-93	AF022440
2	Tonga-74	AY744147
2	TSV01	AY037116
2	Taiwán-1008FHD	AY776328
2	Ven2	AF100465
3	D3-H-IMTSSA-MART-1999-1243	AY099337
3	D3-H-IMTSSA-SRI-2000-1266	AY099336
3	80-2	AF317645
3	98901403	AB189125
3	98901437	AB189126
3	98901517	AB189127AB189128
3	98902890	

ES 2 585 553 T3

Serotipo	Cepa	N.º de Registro
3	BA51	AY858037
3	BDH02-1	AY496871
3	BDH02-3	AY496873
3	BDH02-4	AY496874
3	BDH02-7	AY496877
3	BR74886-02	AY679147
3	C0331-94	AY876494
3	C0360-94	AY923865
3	den3_88	AY858038
3	den3_98	AY858039
3	FW01	AY858040
3	FW06	AY858041
3	H87	NC 001475
3	D3-Hu-TL018NIID-2005	AB214879
3	D3-Hu-TL029NIID-2005	AB214880
3	D3-Hu-TL109NIID-2005	AB214881
3	D3-Hu-TL129NIID-2005	AB214882
3	InJ 16 82	DQ401690
3	KJ30i	AY858042
3	KJ46	AY858043
3	KJ71	AY858044
3	Mutante BDH0_801	DQ401689
3	Mutante BDH02_03	DQ401691
3	Mutante BDH02_04	DQ401692
3	Mutante BDH02_07	DQ401693
3	Mutante InJ_16_82	DQ401694
3	Mutante PhMH_J1_97	DQ401695
3	PF89-27643	AY744677
3	PF89-320219	AY744678
3	PF90-3050	AY744679
3	PF90-3056	AY744680
3	PF90-6056	AY744681
3	PF92-2956	AY744682
3	PF92-2986	AY744683
3	PH86	AY858045
3	PhMH-J1-97	AY496879
3	PI64	AY858046

ES 2 585 553 T3

Serotipo	Cepa	N.º de Registro
3	Singapur	AY662691
3	Singapur 8120-95	AY766104
3	Sleman-78	AY648961
3	TB16	AY858047
3	TB55i	AY858048
3	ThD3_0007_87	AY676353
3	ThD3_0010_87	AY676353
3	ThD3_0055_93	AY676351
3	ThD3_0104_93	AY676350
3	ThD3_1283_98	AY676349
3	ThD3_1687_98	AY676348
3	PF92-4190	AY744684
3	PF94-136116	AY744685
3	Taiwán-739079A	AY776329
4	2A	AF375822
4	Clon recombinante rDEN4	AF326825
4	2Adel30	AF326826
4	814669	AF326573
4	B5	AF289029
4	rDEN4del30	AF326827
4	H241	AY947539
4	rDEN4	NC 002640
4	Singapur 8976-95	AY762085
4	SW38i	AY858050
4	ThD4_0017_97	AY618989
4	ThD4_0087_77	AY618991
4	ThD4_0348_91	AY618990
4	ThD4_0476_97	AY618988
4	ThD4_0485_01	AY618992
4	ThD4_0734_00	AY618993
4	Taiwán-2K0713	AY776330
4	Desconocida	M14931

En la UTR-3' de un clon infeccioso de tipo silvestre, por ejemplo, en la cepa Sleman/78 del serotipo 3 del virus del dengue, o en un clon infeccioso de otro virus del dengue virulento, de tipo silvestre, pueden realizarse mutaciones, y los mutantes pueden después someterse a ensayo en un sistema de modelo animal (por ejemplo, en sistemas de modelo de ratón y/o mono) para identificar sitios que causan atenuación. La atenuación se juzga, por ejemplo, por detección de viremia disminuida. Una o más mutaciones adicionales, que se descubrió que atenuaban el virus de tipo silvestre, se introdujeron opcionalmente en un virus del dengue del tipo silvestre, y estos mutantes se sometieron a ensayo en un sistema de modelo animal, (por ejemplo, en un sistema de modelo de ratón y/o un mono) para determinar si los mutantes resultantes estaban atenuados. Se descubrió que los mutantes que estaban atenuados podían después usarse como nuevas cepas de vacunas que, debido a la atenuación, tenían seguridad aumentada.

Además de los virus indicados anteriormente, en la divulgación se incluyen virus del dengue, incluyendo virus del dengue quiméricos, que incluyen una o más mutaciones atenuantes. Estas quimeras pueden consistir en un virus del dengue de un primer serotipo (es decir, un virus del dengue de referencia) en el que una o más proteínas estructurales se han reemplazado con una o más proteínas estructurales correspondientes de un virus del dengue de un segundo serotipo. Por ejemplo, las quimeras pueden consistir en un virus del dengue de referencia, en el que las proteínas prM y E de virus del dengue del primer serotipo se han reemplazado con las proteínas prM y E de virus del dengue del segundo serotipo. Los virus quiméricos pueden prepararse a partir de cualquier combinación de virus del dengue de diferentes serotipos. El virus del dengue contra el cual se busca la inmunidad es la fuente de la proteína (o proteínas) estructural insertada.

Como se ha indicado anteriormente, las mutaciones que están incluidas en los virus de la presente invención son mutaciones atenuantes. Estas mutaciones están presentes en la estructura UTR-3' del virus del dengue para atenuar el virus. Las mutaciones pueden realizarse en la UTR-3' usando métodos convencionales, tales como mutagénesis dirigida a sitio. Un ejemplo del tipo de mutación presente en los virus son las sustituciones, pero también pueden usarse otros tipos de mutaciones, tales como deleciones e inserciones. Además, como se ha indicado anteriormente, las mutaciones pueden estar presentes individualmente o en el contexto de una o más mutaciones adicionales.

En referencia a la Figura 1, se adoptaron dos estrategias para atenuar el virus del dengue. En un aspecto, se delecionaron nucleótidos adicionales en la mutación $\Delta 30$ desde la UTR-3'. En otro aspecto, la UTR-3' de un virus del dengue de un primer serotipo se reemplazó con la UTR-3' de un virus del dengue de un segundo serotipo (que opcionalmente contenía la mutación $\Delta 30$ y nucleótidos adicionales en la mutación $\Delta 30$ delecionados de la UTR-3').

Delección de nucleótidos adicionales a la mutación $\Delta 30$ de la UTR-3'

En relación a las Figuras 2 - 5, usando la primera estrategia, la UTR-3' de los virus del dengue contienen diversos motivos de secuencia conservados. La secuencia de la UTR-3' de DEN4 se ilustra en la Figura 5. El genoma de la cepa 814669 de DEN4 contiene 10.646 nucleótidos, de los cuales los últimos 384 nt en el extremo 3' están sin traducir (sin codificar). Las localizaciones de los diversos componentes de secuencia en esta región se designan con el sistema de numeración inversa. Estas secuencias incluyen la estructura secundaria distal 3' (nt 1 a 93), prevista para formar el tallo-bucle 1 (SL-1, *stem-loop 1*), que contiene el bucle terminal 1 (TL-1, *terminal loop 1*). Los nucleótidos 117-183 forman el tallo-bucle 2 (SL-2) que contiene el TL-2. Los nucleótidos 201 - 277 forman un par de tallo-bucles (SL-3) que en parte contienen el TL-3. Aunque la secuencia primaria del tallo-bucle 1 difiere ligeramente entre los serotipos del dengue, la estructura secundaria está estrictamente conservada (compárense las Figuras 2-5). Aunque la separación de nucleótidos entre SL-2 y los SL-1 y SL-3 adyacentes difiere entre los serotipos del virus del dengue, la estructura global de SL-2 está bien conservada. Además, los nueve nucleótidos expuestos que comprenden el TL-2 son idénticos entre los 4 serotipos del dengue. Esto es, el TL-2 y su estructura tallo de soporte que se han retirado por la mutación $\Delta 30$ (aproximadamente nt 143 - 172). La retirada de estos 30 nucleótidos produce la formación de un nuevo elemento estructural previsto (SL-2 $\Delta 30$) que tiene una secuencia primaria y una secuencia secundaria que es idéntica en cada uno de los serotipos del virus del dengue (compárense las Figuras 6-9).

Las Figuras 10 - 13 ilustran la estrategia en la que nucleótidos adicionales a la mutación $\Delta 30$ están delecionados de la UTR-3'. La mutación $\Delta 30$ retira la estructura homóloga TL-2 en cada uno de los serotipos 1, 2, 3 y 4 del virus del dengue. La estrategia en la que nucleótidos adicionales a la mutación $\Delta 30$ están delecionados de la UTR-3' retira la estructura homóloga y secuencia del TL-2 hasta y opcionalmente incluyendo la estructura homóloga de TL-3 de manera que la delección se extiende hasta el límite 5' de la estructura homóloga de TL-3 en cada uno de los serotipos 1, 2, 3 y 4 del virus del dengue. En la estrategia ilustrada en las Figuras 10-14, una delección adicional de aproximadamente 31 nucleótidos del TL-3 produce la formación de un nuevo elemento estructural previsto (SL-3 $\Delta 31$).

En referencia a las Figuras 14-17, la mutación $\Delta 86$ retira la estructura homóloga TL-2 y retira la secuencia hasta la estructura homóloga TL-3 en cada uno de los serotipos DEN1, DEN2, DEN3 y DEN4 del virus del dengue. Esta delección produce la formación de un nuevo elemento estructural previsto (SL-2 $\Delta 86$).

En algunas realizaciones que implican la delección de nucleótidos adicional a la mutación $\Delta 30$, las deleciones de ácidos nucleicos se realizan en la estructura UTR-3' del genoma del virus del dengue para atenuar el virus manteniendo al mismo tiempo su inmunogenicidad. Las deleciones incluyen la delección $\Delta 30$ (nt 173-143 de la cepa Sleman/78 del serotipo 3 de una manera ejemplar o correspondiente a la misma en otras cepas de DEN1, DEN2, DEN3, o DEN4; la numeración es desde el extremo 3' del genoma vírico) además de la delección de la secuencia UTR-3' adicional que es contigua o no contigua a la delección $\Delta 30$. La delección $\Delta 30$ corresponde a la estructura TL-2 de la UTR-3'. Un tipo de realización, denominada rDEN1 $\Delta 30/31$, rDEN2 $\Delta 30/31$, rDEN3 $\Delta 30/31$, o rDEN4 $\Delta 30/31$ incluye la delección $\Delta 30$ original y una delección no contigua de 31 nt que retira ambas estructuras TL-2 y TL-3 originales. Otro tipo de realización, denominada rDEN1 $\Delta 61$, rDEN2 $\Delta 61$, rDEN3 $\Delta 61$, o rDEN4 $\Delta 61$ incluye la delección $\Delta 30$ y la delección de 31 nucleótidos contiguos que se extiende en 3' desde la delección $\Delta 30$. Otro tipo de realización, denominada rDEN1 $\Delta 86$, rDEN2 $\Delta 86$, rDEN3 $\Delta 86$, o rDEN4 $\Delta 86$, incluye la delección $\Delta 30$ y la delección de 56 nucleótidos contiguos que se extiende en 5' desde la delección $\Delta 30$. Más adelante, en la Tabla 2, para DEN3 se presenta una lista completa de virus mutantes construidos que contienen mutaciones de delección en la UTR-3'.

Reemplazo de la UTR-3' de un virus del dengue de un primer serotipo con la UTR-3' de un virus del dengue de un segundo serotipo

5 Usando la segunda estrategia, la UTR-3' de rDEN3 puede reemplazarse con la UTR-3' de rDEN4, conteniendo opcionalmente la mutación $\Delta 30$ y nucleótidos adicionales a la mutación $\Delta 30$ delecionados de la UTR-3'. Otros ejemplos incluyen el reemplazo de la UTR-3' de rDEN3 con la UTR-3' de los serotipos 1 y 2 del virus del dengue, conteniendo opcionalmente la mutación $\Delta 30$ y nucleótidos adicionales a la mutación $\Delta 30$ delecionados de la UTR-3'. Otros ejemplos incluyen: el reemplazo de la UTR-3' de rDEN1 con la UTR-3' de los serotipos 2, 3 y 4 del virus del dengue, conteniendo opcionalmente la mutación $\Delta 30$ y nucleótidos adicionales a la mutación $\Delta 30$ delecionados de la UTR-3'; el reemplazo de la UTR-3' de rDEN2 con la UTR-3' de los serotipos 1, 3 y 4 del virus del dengue, conteniendo opcionalmente la mutación $\Delta 30$ y nucleótidos adicionales en la mutación $\Delta 30$ delecionados de la UTR-3'; y el reemplazo de la UTR-3' de rDEN4 con la UTR-3' de los serotipos 1, 2 y 3 del virus de dengue, conteniendo opcionalmente la mutación $\Delta 30$ y nucleótidos adicionales a la mutación $\Delta 30$ delecionados desde la UTR-3'.

15 Las realizaciones que implican el reemplazo de la UTR-3' de un virus del dengue de un primer serotipo con la UTR-3' de un virus del dengue de un segundo serotipo incluyen:

- 20 a) rDEN1-3'D2, rDEN1-3'D2x, rDEN1-3'D3, rDEN1-3'D3x, rDEN1-3'D4, rDEN1-3'D4x; rDEN1/2-3'D1, rDEN1/2-3'D1x, rDEN1/2-3'D3, rDEN1/2-3'D3x, rDEN1/2-3'D4, rDEN1/2-3'D4x; rDEN1/3-3'D1, rDEN1/3-3'D1x, rDEN1/3-3'D2, rDEN1/3-3'D2x, rDEN1/3-3'D4, rDEN1/3-3'D4x; rDEN1/4-3'D1, rDEN1/4-3'D1x, rDEN1/4-3'D2, rDEN1/4-3'D2x, rDEN1/4-3'D3, rDEN1/4-3'D3x;
- 25 b) rDEN2-3'D1, rDEN2-3'D1x, rDEN2-3'D3, rDEN2-3'D3x, rDEN2-3'D4, rDEN2-3'D4x; rDEN2/1-3'D2, rDEN2/1-3'D2x, rDEN2/1-3'D3, rDEN2/1-3'D3x, rDEN2/1-3'D4, rDEN2/1-3'D4x; rDEN2/3-3'D1, rDEN2/3-3'D1x, rDEN2/3-3'D2, rDEN2/3-3'D2x, rDEN2/3-3'D4, rDEN2/3-3'D4x; rDEN2/4-3'D1, rDEN2/4-3'D1x, rDEN2/4-3'D2, rDEN2/4-3'D2x, rDEN2/4-3'D3, rDEN2/4-3'D3x;
- 30 c) rDEN3-3'D1, rDEN3-3'D1x, rDEN3-3'D2, rDEN3-3'D2x, rDEN3-3'D4, rDEN3-3'D4x; rDEN3/1-3'D2, rDEN3/1-3'D2x, rDEN3/1-3'D3, rDEN3/1-3'D3x, rDEN3/1-3'D4, rDEN3/1-3'D4x; rDEN3/2-3'D1, rDEN3/2-3'D1x, rDEN3/2-3'D3, rDEN3/2-3'D3x, rDEN3/2-3'D4, rDEN3/2-3'D4x; rDEN3/4-3'D1, rDEN3/4-3'D1x, rDEN3/4-3'D2, rDEN3/4-3'D2x, rDEN3/4-3'D3, rDEN3/4-3'D3x; y
- 35 d) rDEN4-3'D1, rDEN4-3'D1x, rDEN4-3'D2, rDEN4-3'D2x, rDEN4-3'D3, rDEN4-3'D3x; rDEN4/1-3'D2, rDEN4/1-3'D2x, rDEN4/1-3'D3, rDEN4/1-3'D3x, rDEN4/1-3'D4, rDEN4/1-3'D4x; rDEN4/2-3'D1, rDEN4/2-3'D1x, rDEN4/2-3'D3, rDEN4/2-3'D3x, rDEN4/2-3'D4, rDEN4/2-3'D4x; rDEN4/3-3'D1, rDEN4/3-3'D1x, rDEN4/3-3'D2, rDEN4/3-3'D2x, rDEN4/3-3'D4, rDEN4/3-3'D4x;
- en el que x es una mutación indicada en la Tabla 2.

Método de preparación y uso del virus del dengue o de virus del dengue quiméricos

40 Los virus (incluyendo virus quiméricos) de la presente invención pueden prepararse usando métodos convencionales en la técnica. Por ejemplo, una molécula de ARN correspondiente al genoma de un virus puede introducirse en células hospedadoras, por ejemplo, células Vero, a partir de las cuales (o de sus sobrenadantes) pueden purificarse después virus descendientes. En este método, una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ARN), correspondiente al genoma de un virus, se introduce en las células hospedadoras, el virus se recoge del medio en el que se han cultivado las células y el virus se formula con fines de vacunación.

45 Los virus de la invención pueden administrarse como agentes profilácticos primarios en adultos o en niños en riesgo de infección, o pueden usarse como agentes secundarios para el tratamiento de pacientes infectados. Por ejemplo, en el caso del virus DEN y del virus DEN quimérico, las vacunas pueden usarse en adultos o en niños con riesgo de infección por virus DEN o pueden usarse como agentes secundarios para el tratamiento de pacientes infectados con el virus DEN. Los ejemplos de pacientes que pueden tratarse usando las vacunas relacionadas con el virus DEN y los métodos de la divulgación incluyen (i) niños en zonas en las que el virus DEN es endémico; (ii) viajeros extranjeros, (iii) personal militar, y (iv) pacientes en zonas de una epidemia del virus DEN. Además, de acuerdo con la divulgación, pueden tratarse habitantes de regiones en las que se ha observado que la enfermedad se está expandiendo (por ejemplo, más allá de Sri Lanka, África oriental y América Latina) o regiones en las que puede observarse expansión en el futuro.

55 La formulación de los virus de la invención puede realizarse usando métodos que son convencionales en la técnica. Se conocen bien numerosas soluciones farmacéuticamente aceptables para su uso en la preparación de vacunas y los expertos en la técnica pueden adaptarlas fácilmente para su uso en la presente invención (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences (18ª edición), ed. A. Gennaro, 1990, Mack Publishing Co., Easton, PA). Los virus pueden diluirse en una solución fisiológicamente aceptable, tal como solución salina estéril, solución salina estéril tamponada, o medio L-15. En otro ejemplo, los virus pueden administrarse y formularse, por ejemplo, como un fluido recogido de cultivos celulares infectados con virus del dengue o virus del dengue quiméricos.

65 Las vacunas pueden administrarse usando métodos que son muy conocidos en la técnica y los expertos en la materia pueden determinar fácilmente cantidades apropiadas de las vacunas administradas. Por ejemplo, los virus de la invención pueden formularse como soluciones acuosas estériles que contengan entre 10^2 y 10^7 unidades infecciosas

(por ejemplo, unidades formadoras de placa o dosis infecciosas de cultivo tisular) en un volumen de dosis de 0,1 a 1,0 ml, para administrar, por ejemplo, por vía intramuscular, subcutánea o intradérmica. Además, las vacunas pueden administrarse en una sola dosis u, opcionalmente, la administración puede implicar el uso de una dosis de sensibilización seguida de una dosis de refuerzo que se administra, por ejemplo, 2-6 meses más tarde, tal como los expertos en la técnica determinen que sea apropiado.

Opcionalmente, los adyuvantes que conocen los expertos en la materia pueden usarse en la administración de los virus de la invención. Los adyuvantes que pueden usarse para potenciar la inmunogenicidad de los virus incluyen, por ejemplo, formulaciones liposomales, adyuvantes sintéticos, tales como (por ejemplo, QS21), muramil dipéptido, monofosforil lípido A, o polifosfacina. Aunque estos adyuvantes se usan típicamente para potenciar respuestas inmunitarias contra vacunas inactivadas, también pueden usarse con vacunas vivas.

Secuencias de ácido nucleico

Las secuencias de ácido nucleico de los virus DEN son útiles para diseñar sondas y cebadores de ácido nucleico para la detección de UTR 3' de delección o quiméricas en una muestra o espécimen con alta sensibilidad y especificidad. Las sondas o cebadores correspondientes a las UTR 3' de delección o quiméricas pueden usarse para detectar la presencia de UTR 3' de delección o quiméricas en general en la muestra, para cuantificar la cantidad de UTR 3' de delección o quiméricas en la muestra o monitorizar el progreso de las terapias usadas para tratar una infección ocasionada por virus DEN. Las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos correspondientes son útiles como herramientas de laboratorio para estudiar los organismos y las enfermedades y desarrollar terapias y tratamientos para las enfermedades.

Las sondas y cebadores de ácidos nucleicos hibridan selectivamente con moléculas de ácido nucleico que codifican las UTR 3' de delección o quiméricas o secuencias complementarias de las mismas. Por "selectiva" o "selectivamente" se entiende que es una secuencia que no se hibrida con otros ácidos nucleicos para impedir la detección adecuada de las UTR 3' de delección o quiméricas. Por lo tanto, en el diseño de ácidos nucleicos que se hibridan, la selectividad dependerá de los otros componentes presentes en la muestra. El ácido nucleico que se hibrida debe tener una complementariedad de al menos 70 % con el segmento del ácido nucleico con el cual se hibrida. Como se usa en el presente documento para describir ácidos nucleicos, la expresión "que se hibrida selectivamente" excluye los ácidos nucleicos ocasionales que se hibridan al azar, y por tanto tiene el mismo significado que "se hibrida específicamente". Las sondas y cebadores de ácidos nucleicos que se hibridan selectivamente pueden tener una complementariedad de al menos 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % y 99 % con el segmento de la secuencia con la que se hibrida, preferentemente de 85 % o más.

La presente divulgación también contempla secuencias, sondas y cebadores que hibridan selectivamente con el ácido nucleico codificante o con la cadena complementaria, u opuesta, del ácido nucleico. La hibridación específica con ácido nucleico puede producirse con modificaciones o sustituciones minoritarias en el ácido nucleico, siempre que se mantenga la capacidad de hibridación funcional entre especies. Por "sonda" o "cebador" se entiende secuencias de ácido nucleico que pueden usarse como sondas o cebadores para la hibridación selectiva con secuencias de ácido nucleico complementarias para su detección o amplificación, cuyas sondas o cebadores pueden variar, en cuanto a su longitud, de aproximadamente 5 a 100 nucleótidos, o preferentemente de aproximadamente 10 a 50 nucleótidos, o más preferentemente de aproximadamente 18-24 nucleótidos. En el presente documento se proporcionan ácidos nucleicos aislados que hibridan selectivamente con ácidos nucleicos específicos de especie en condiciones rigurosas y que deben tener al menos cinco nucleótidos complementarios a la secuencia de interés como se describe en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Sambrook, Fritsch y Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

Si se usan como cebadores, la composición incluye preferentemente al menos dos moléculas de ácido nucleico que hibridan en diferentes regiones de la molécula diana para amplificar una región deseada. Dependiendo de la longitud de la sonda o del cebador, la región diana puede variar entre una complementariedad de bases del 70 % y una complementariedad de bases completa, y en condiciones rigurosas seguirá hibridando. Por ejemplo, con el fin de detectar la presencia de las UTR 3' de delección o quiméricas, el grado de complementariedad entre el ácido nucleico (sonda o cebador) de hibridación y la secuencia con la cual se hibrida es al menos suficiente para diferenciar la hibridación con un ácido nucleico de otros organismos.

Las secuencias de ácido nucleico incluyen una sonda de diagnóstico que sirve para revelar la detección de un amplicón de ADNc amplificado a partir del molde de ARN genómico vírico usando una reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), así como amplímeros directos e inversos que se diseñan para amplificar el amplicón de ADNc. En determinados casos, uno de los amplímeros se diseña para que contenga una mutación específica de virus de la vacuna en el extremo 3' terminal del amplímero, que efectivamente hace que el ensayo sea incluso más específico para la cepa de la vacuna debido a la que extensión del cebador en el sitio diana, y por consiguiente la amplificación, se producirá solo si el molde de ARN vírico contiene esa mutación específica.

Recientemente se han desarrollado sistemas de detección de secuencias de ácido nucleico basados en PCR automatizada. En general, se usa el ensayo TaqMan (Applied Biosystems). Una estrategia desarrollada más

recientemente para el ensayo genético diagnóstico utiliza Molecular Beacon (Tyagi y Kramer 1996 Nature Biotechnology 14: 303-308). Los ensayos Molecular Beacon emplean un desactivador y colorantes indicadores que se diferencian de los usados en el ensayo TaqMan. Un experto en la técnica puede utilizar estos y otros sistemas de detección.

5 Componentes de la vacuna del virus del Dengue de tipo 3 (DEN3) generados por la introducción de deleciones en la región no traducida (UTR) 3' o intercambio de la UTR 3' de DEN3 con la de DEN4

10 Hay cuatro serotipos del virus del dengue (DEN1, DEN2, DEN3 y DEN4) que circulan en regiones tropicales y subtropicales del mundo pobladas por más de 2,5 billones de personas (Gubler DJ 1998 Clin Microbiol Rev 11: 480-496). Los virus DEN son endémicos en al menos 100 países y causan más enfermedades humanas que ningún otro arbovirus. Anualmente, se calcula que hay de 50 a 100 millones de infecciones por dengue y cientos de miles de casos de fiebre hemorrágica/síndrome de choque por dengue (FHE/SCD) por dengue con niños que llevan mucha carga de la enfermedad (Gubler DJ y Meltzer M 1999 Adv Virus Res 53: 35-70). La infección FHD/SCD sigue siendo una causa principal de hospitalización y muerte de niños en al menos ocho países del sudeste asiático (World Health Organization 1997 Dengue Haemorrhagic Fever: Diagnosis, Treatment, Prevention and Control, 2ª edición, WHO, Ginebra). El aumento drástico tanto de la frecuencia como de la gravedad de la enfermedad causada por los cuatro serotipos DEN durante las dos últimas décadas se debe, en gran parte, a la expansión geográfica de los mosquitos vectores, *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*, y a la prevalencia aumentada de los cuatro serotipos DEN (Gubler DJ 1998 Clin Microbiol Rev 11: 480-496). Los virus del dengue se mantienen en un ciclo de vida de transmisión del mosquito al ser humano al mosquito, sin ninguna otra reserva vírica aparente que participe en este ciclo de vida en entornos urbanos (Rice CM, 1996 en Flaviviridae: The viruses and their replication, Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Straus SE, eds. Fields Virology. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, págs. 931-959).

25 Los virus DEN, miembros de la familia Flaviviridae, tienen viriones esféricos de aproximadamente 40 a 60 nm que contienen un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo. Un solo polipéptido se procesa co-traduccionally a través de proteasas víricas y celulares que generan tres proteínas estructurales (cápside C, membrana M y envoltura E) y al menos siete proteínas no estructurales (NS). La organización del genoma de los virus DEN es 5'-UTR-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2BNS3-NS4A-NS4B-NS5-UTR-3' (región no traducida UTR, prM precursor de membrana) (Rice CM, 1996 en Flaviviridae: The viruses and their replication, Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Straus SE, eds. Fields Virology. Filadelfia: Lippincott-Raven Publishers, págs. 931-959).

35 En respuesta a la frecuencia en aumento y a la gravedad de la infección por DEN, se está buscando el desarrollo de vacunas para impedir la enfermedad por el virus DEN. Una vacuna económica que impide la enfermedad causada por el virus DEN ha llegado a tener una prioridad global para la salud pública. La rentabilidad, seguridad y eficacia prolongada, asociada con la vacuna viva atenuada contra el virus de la fiebre amarilla (FA), otro flavivirus transmitido por mosquitos, sirve como un modelo para la viabilidad de desarrollar una vacuna contra el virus DEN atenuada viva (Monath TP, 1999 en Yellow fever, Plotkin SA, Orenstein WA, eds. Vaccines, Filadelfia: W.B. Saunders Co., 815-879). Adicionalmente, en Asia se usa una vacuna eficaz atenuada, viva, contra el virus de la encefalitis japonesa (EJ) y se dispone de vacunas de virus inactivados para la EJ y para virus causantes de encefalitis transmitidos por garrapatas. La necesidad de una vacuna contra el virus DEN es cada vez mayor y, a pesar de muchos esfuerzos, aún no se ha conseguido el objetivo de desarrollar una vacuna que sea segura y eficaz contra el virus DEN. Una vacuna del virus DEN eficaz debe conferir protección para cada uno de los serotipos ya que los cuatro serotipos circulan normalmente en regiones endémicas y la infección secundaria con un serotipo heterólogo está asociada con un aumento de la gravedad de la enfermedad.

50 Se han empleado dos estrategias para generar componentes de vacuna atenuada viva contra cada serotipo que después pueden combinarse en formulaciones tetravalentes (Blaney JE *et al.* 2006 Viral Immunol. 19: 10-32). En primer lugar, se ha usado genética inversa para introducir una mutación por deleción ($\Delta 30$) atenuante de 30 nucleótidos en la UTR 3' de clones de ADNc de cada serotipo DEN (Durbin, AP *et al.* 2001 Am J Trop Med Hyg 65: 405-413; Whitehead SS *et al.* 2003 J Virol 77: 1653-1657; Blaney JE *et al.* 2004 Am J Trop Med Hyg 71: 811-821; Blaney JE *et al.* 2004 BMC Inf Dis 4: 39). Inicialmente, se descubrió que el componente rDEN4 $\Delta 30$ de la vacuna estaba atenuado en monos rhesus (Tabla 1) y en ensayos clínicos en fase I/II en seres humanos se ha demostrado que la infección por el virus da como resultado una viremia baja, que es fuertemente inmunogénica y que presenta reactividad mínima sin observación de acontecimientos adversos graves (Durbin, A. P. *et al.* 2001 Am J Trop Med Hyg 65: 405-413; Durbin *et al.* 2005 J Inf Dis 191: 710-718). Recientemente, se ha descubierto que el componente rDEN1 $\Delta Z 30$ de la vacuna, que también está atenuado en monos rhesus (Tabla 1), comparte un fenotipo similar en ensayos clínicos, como el que se observa para rDEN4 $\Delta 30$; viremia baja, fuerte inmunogenicidad y reactividad mínima en 20 voluntarios (Whitehead SS *et al.* 2003 J Virol 77: 1653-1657; Blaney JE *et al.* 2006 Viral Immunol. 19: 10-32). Desgraciadamente, los componentes rDEN2 $\Delta 30$ y rDEN3 $\Delta 30$ de la vacuna, no parecieron estar satisfactoriamente atenuados en monos rhesus durante un ensayo preclínico y no se planteó ensayar esto en seres humanos (Tabla 1) (Blaney JE *et al.* 2004 Am J Trop Med Hyg 71: 811-821; Blaney JE *et al.* 2004 BMC Inf Dis 4: 39). Por consiguiente, una estrategia alternativa para el desarrollo de vacunas ha sido la generación de virus quiméricos

antigénicos por reemplazo de proteínas estructurales del componente rDEN4 Δ 30 de la vacuna atenuado con los de DEN2 o DEN3 dando lugar a los componentes rDEN2/4 Δ 30 y rDEN3/4 Δ 30 de la vacuna, respectivamente (Whitehead SS *et al.* 2003 Vaccine 21: 4307-4316; Blaney JE *et al.* 2004 Am J Trop Med Hyg 71: 811-821). El virus de la vacuna rDEN2/4 Δ 30 se ha ensayado en seres humanos y parece ser seguro y fuertemente inmunogénico, al mismo tiempo que actualmente se plantea la evaluación clínica del virus rDEN3/4 Δ 30.

5

Tabla 1. Efectos de la mutación Δ 30 en los cuatro serotipos DEN en monos rhesus

Virus	Viremia ³			Media geométrica título de anticuerpo neutralizante ^b	Referencia
	% de monos virémicos	Nº medio de días virémicos por mono	Título promedio de virus máximo (log ₁₀ UFC/ml \pm DT)		
rDEN1	100	2,8	2,1 \pm 0,1	1.230	
rDen1 Δ 30	50	0,5	0,8 \pm 0,1	780	Whitehead <i>et al.</i> J.Virol, 2003, 77: 1653
rDEN2	100	4,0	1,9 \pm 0,1	173	
rDen2 Δ 30	100	2,8	1,7 \pm 0,2	91	Blaney <i>et al.</i> BMC Inf Dis., 2004, 4:39
rDEN3	100	2,3	1,4 \pm 0,2	363	
rDen3 Δ 30	100	2,0	1,4 \pm 0,2	265	Blaney <i>et al.</i> Am. J. Trop. Med. Hyg., 2004, 71: 811
rDEN4	100	3,0	2,2 \pm 0,2	322	
rDen4 Δ 30	100	2,0	1,4 \pm 0,2	154	Hanley <i>et al.</i> Vaccine, 2004, 22:3440

^a Grupos de monos rhesus se inocularon por vía subcutánea con 5,0 log₁₀ UFP de los virus indicados a una dosis de 1 ml. El suero se recogió todos los días durante 10 días. El título del virus en suero se determinó mediante ensayo en placa en células Vero.

^b Los títulos de anticuerpos neutralizantes por reducción de placas (60 %) se determinaron en suero el día 28 usando los virus de tipo silvestre indicados. Se indica media geométrica de la dilución recíproca.

En este caso, se describen nuevos componentes de vacuna para el serotipo DFN3 generados por modificación genética de la UTR 3' del clon de ADNc de DEN3 (Blaney JE *et al.* 2004 Am J Trop Med Hyg 71: 811-821). El desarrollo de estos componentes de vacuna DEN3, que poseen el complemento completo de las proteínas DEN3 de tipo silvestre, es importante por dos razones. La primera es que el componente de la presente vacuna para DEN3, rDEN3/4 Δ 30, puede encontrarse que está infra- o sobre- atenuado en ensayos clínicos. La segunda razón es que una vacuna óptima para conferir protección de la enfermedad causada por DEN3 puede requerir la inducción de respuestas de linfocitos T contra todo el conjunto de proteínas DEN3, en lugar de solo para M y E que son las únicas secuencias de DEN3 presentes en el virus quimérico rDEN4 Δ 30. Para generar componentes de vacuna DEN3 adicionales, se introdujeron nuevas deleciones que incluían o limitaban la deleción Δ 30 en la UTR 3' en el clon de ADNc de rDFN3. Como alternativa, la UTR 3' del clon de ADNc de rDEN3 se reemplazó con la rDEN4 o rDEN4 Δ 30. Se analizaron virus viables para los fenotipos atenuantes en cultivos celulares, en ratones SCID trasplantados con células HuH-7 y en monos rhesus. Tres virus mutantes (rDEN3 Δ 30/31, rDEN3 Δ 86, y rDEN3-3'D4 Δ 30) tienen fenotipos preclínicos, lo que sugiere que pueden ser seguros e inmunogénicos en seres humanos.

10

15

20

Generación de mutantes de deleción rDEN3

25

Se buscó generar mutaciones de deleción expandidas que incluían la mutación original Δ Z30 (nt 173-143). La Tabla 2 enumera siete mutaciones de deleción que abarcan la mutación Δ 30 original, incluyendo Δ 50, Δ 61, Δ 80, Δ 86, Δ 116A, Δ 116B, y Δ 146. Además, la mutación Δ 30/31 incluye la mutación original Δ 30 y una deleción no contigua de 31 nt. También se generó la mutación Δ 31 solo para diferenciar la contribución de cualquiera de Δ Z30 o Δ 31 en la mutación por deleción combinada Δ 30/31. La localización de nucleótidos de deleciones adyacentes en la estructura secundaria prevista de la UTR 3' de DEN3 se indica en la Figura 4. Además, la estructura secundaria prevista de la UTR 3' de DEN3 para rDEN3 Δ 30, rDEN3 Δ 30/31 y rDEN3 Δ 86 se indica en las Figuras 8, 12 y 16, respectivamente.

30

Tabla 2. Mutaciones por deleción creadas en la UTR 3' de la cepa Sleman/78 de DEN3

Mutación	Nucleótidos delecionados ^a	Unión de deleción
Δ 30	173 - 143	-CCAA Δ GACU-
Δ 31	258-228	-CUGC Δ GACU-
Δ 50	192-143	-CACA Δ GACU-
Δ 61	173-113	-CCGA Δ UAAA-

Mutación	Nucléotidos delecionados ^a	Unión de deleción
Δ80	192-113	-CACAAΔUAAA-
Δ86	228-143	-UAGCΔGACU-
Δ116(A)	228-113	-UAGCΔUAAA-
Δ116(B)	258-143	-CUGCΔGACU-
Δ146	258-113	-CUGCΔUAAA-
Δ30/31	173-143	-CCAAΔGACU-
	258-228	-CUGCΔGACU-

^a La numeración es desde el extremo 3' del genoma vírico

Para introducir las nueve mutaciones de deleción nuevas en el plásmido de ADNc de la cepa Sleman/78 de DEN3, p3, que previamente se usó para generar el componente de vacuna rDEN3Δ30 (Blaney JE *et al.* 2004 Am J Trop Med Hyg 71: 811-821) se usó mutagénesis dirigida por PCR. El subclón de ADNc p3-frag.4 se usó como molde para las reacciones de la PCR con los pares de oligonucleótidos mutagénicos indicados enumerados en la Tabla 3, excepto para la mutación por deleción Δ30/31 que como molde usó el subclón de ADNc p3-frag.4Δ30. Los productos de la PCR se ligaron y se usaron para transformar células bacterianas competentes. El ADN plasmídico se aisló de clones bacterianos y la presencia de la mutación de deleción apropiada se confirmó mediante análisis de secuencia. Para generar plásmidos de ADNc de DEN3 intactos que contenían las mutaciones de deleción, se introdujo el fragmento *KpnI-PstI* (963 nt) de los subclones del ADNc p3-frag.4 mutado en el plásmido de ADNc p3-7164. El plásmido p3-7164 codifica la mutación por adaptación de células Vero 7164 que previamente habían mostrado que potenciaban el crecimiento y la eficacia de transfección en células Vero (Blaney JE *et al.* 2004 Am J Trop Med Hyg 71: 811-821). Se confirmó que los plásmidos p3 de longitud completa, que contenían las mutaciones de deleción, contenían la secuencia correcta de la UTR 3'. Además de las deleciones modificadas por ingeniería genética, se identificaron mutaciones en los virus rDEN3Δ30/31 y rDEN3Δ86, cuando se comparó con el ADNc plasmídico p3 de DEN3 (Genbank n.º AY656169) (Tabla 4).

Tabla 3. Secuencias cebadoras mutagénicas para la construcción de deleciones en la UTR 3'

Nombre del cebador	Secuencia (5' → 3')
113F	TAAAAACAGCATATTGACGCTGGGAG (SEQ ID NO: 24)
143F	GACTAGAGGTTAGAGGAGAC (SEQ ID NO: 25)
228F	GACTAGCGGTTAGAGGAGACCCC (SEQ ID NO: 26)
173R	TCGGGCCCGCTGCTGCGTTG (SEQ ID NO: 27)
173R (para Δ30)	TTGGGCCCGCTGCTGCGTTG (SEQ ID NO: 28)
192R	TGTGTCATGGGAGGGGTCTC (SEQ ID NO: 29)
228R	GCTACACCGTGCGTACAGCTTCC (SEQ ID NO: 30)
258R	GCAGCCTCCCAGGTTTTACGTCC (SEQ ID NO: 31)

Tabla 4. Mutaciones, además de las deleciones modificadas por ingeniería genética, que se identificaron en los virus rDEN3Δ30/31 y rDEN3Δ86 cuando se comparó con el ADNc plasmídico de p3 de DEN3 (Genbank n.º AY656169)

Virus	Gen	Posición de nucleótido	Sustitución de nucleótido	Posición de aminoácido	Cambio de aminoácido
rDEN3Δ30/31	NS4B	7164 ^a	U → C	115	Val → Ala
	NS4B	7398	C → U	193	Ala → Val
rDEN3Δ86	M	512	A → G	26	Lys → Glu
	NS3	6076	C → U	521	silencioso
	NS4B	7164 ^a	U → C		Val → Ala
	NS5	8623	U → C	353	silencioso
	NS5	10267 ^b	A → U	TERMINAL	terminal → Tyr
	UTR-3'	10455	G → C	-	-

^a La mutación 7164 es una mutación por adaptación de células Vero que se modificó por ingeniería genética en la construcción de ADNc.

^b Hay una población mixta en esta posición de nt (A → A/U) que cambia el codón de terminación (UAA) en el extremo de NS5 por UAU que codifica Tyr. Esto serviría para extender NS5 en 2 aminoácidos (Tyr-Thr-Terminal) ya que permanece un codón de terminación en los nucleótidos 10271-10273.

Para la recuperación de virus, se sintetizaron *in vitro* transcritos de ARN con caperuza (*capped*) en el extremo 5' de plásmidos de ADNc y se transfectaron en células Vero o en células C6/36. Antes de la transcripción y generación de virus infecciosos, las secuencias enlazadoras se retiraron de los plásmidos de ADNc por digestión con *SpeI*. Después los plásmidos se recircularizaron por ligamiento, se linealizaron con *Acc651* (isoesquizómero de *KpnI* que escinde dejando únicamente un solo nucleótido en 3') y se transcribieron *in vitro* usando polimerasa SP6. Después los transcritos purificados se transfectaron en células Vero o C6/36.

Los virus recombinantes que codificaban cada una de las nueve mutaciones, $\Delta 30/31$, $\Delta 31$, $\Delta 50$, $\Delta 61$, $\Delta 80$, $\Delta 86$, $\Delta 116A$, $\Delta 116B$, y $\Delta 146$, se recuperaron satisfactoriamente en células C6/36, mientras que en células Vero solo se recuperó rDEN $\Delta 31$. Después, los virus mutantes por delección rDEN3 se pasaron una vez en células Vero seguido de clonación biológica mediante dos diluciones terminales en células Vero. Los virus clonados se pasaron de dos a siete veces en células Vero en un intento de alcanzar un título de choque de al menos $6,0 \log_{10}$ UFP/ml que se considera que es suficiente para permitir una fabricación rentable. Se descubrió que tres virus recombinantes (rDEN3 $\Delta 50$, rDEN3 $\Delta 116A$ y rDEN3 $\Delta 146$) estaban excesivamente restringidos para la replicación en células Vero, a pesar de que eran viables. Por lo tanto, estos tres virus no se estudiaron posteriormente. La secuencia genética de la UTR 3' se determinó para los seis virus mutantes por delección restantes que alcanzaron títulos pico de virus de al menos $6,0 \log_{10}$ UFP/ml. La secuencia UTR 3' correcta con la delección apropiada se descubrió para rDEN3 $\Delta 61$, rDEN3 $\Delta 80$, rDEN3 $\Delta 86$ y rDEN3 $\Delta 30/31$. Sin embargo, se descubrieron dos virus mutantes que contenían delecciones o mutaciones adicionales y que se consideró que posiblemente tenían genotipos inestables. En primer lugar, rDEN3 $\Delta 31$ tenía la delección UTR 3' correcta de 258-228 nt pero también contenía una delección de 25 nt del nt 222 al 198. En segundo lugar, rDEN3 $\Delta 116B$ tenía la delección UTR 3' correcta de 258-143 nt pero también contenía una delección de 8 nt del nt 430 al 423 y una sola sustitución A \rightarrow G en el nt 265. El potencial de inestabilidad genética con estos virus imposibilita su uso como componentes de vacuna de manera que no estudiaron posteriormente. Por lo tanto, de las nueve delecciones originales construidas, se descubrió que cuatro virus mutantes se replicaban de un modo eficaz en células Vero y se estudiaron posteriormente; rDEN3 $\Delta 61$, rDEN3 $\Delta 80$, rDEN3 $\Delta 86$ y rDEN3 $\Delta 30/31$.

20 Generación de virus quiméricos rDEN3 con la UTR 3' procedente de rDEN4 o rDEN4 $\Delta 30$

Se empleó otra estrategia para generar nuevos componentes de vacuna rDEN3; el reemplazo de la UTR 3' del clon de ADNc de rDEN3 con la de rDEN4 o rDEN4 $\Delta 30$ (Figura 18A). El virus quimérico de UTR 3', rDEN3-3'D4 $\Delta 30$, se diseñó para ser un componente de vacuna para su inclusión en formulaciones tetravalentes que comparten la mutación por delección $\Delta Z30$ entre los cuatro serotipos. Para diferenciar la contribución de la quimerización de la UTR 3' y la mutación $\Delta 30$ en cualquiera de los fenotipos observados, se diseñó el virus rDEN3-3'D4.

El plásmido p3-3'D4 $\Delta 30$ se generó de la siguiente manera. En primer lugar, se usó mutagénesis por PCR para introducir un sitio de restricción *HpaI* en el subclón de ADNc p3-frag.4 (Figura 18B). Los productos de la PCR se ligaron y se usaron para transformar células bacterianas competentes. El ADN plasmídico se aisló de los clones bacterianos y la presencia de la mutación de delección apropiada se confirmó mediante análisis de secuencia. Para introducir la UTR 3' rDEN4 $\Delta 30$ en el subclón de ADNc p3-frag.4 (*HpaI*), por PCR se amplificó un fragmento de 364 nt que abarcaba la UTR 3' $\mu p4\Delta 30$, usando un cebador directo (5'-ACAACAACAACACCAAAGGCTATTG-3', SEQ ID NO: 32) y un cebador inverso (5'-CCTACCGGTACCAGAACCTGTTG-3', SEQ ID NO: 33). Para generar el subclón de ADNc p3-frag.4-3'D4 $\Delta 30$, el fragmento *HpaI-KpnI* se retiró de p3-frag.4(*HpaI*) y se reemplazó con el fragmento de la PCR de la UTR 3' p4 $\Delta 30$ que se había escindido mediante *KpnI*. El fragmento *PstI-KpnI* de p3-frag.4-3'D4 $\Delta 30$ se introdujo en el plásmido p3 para crear el clon de ADNc de longitud completa, p3-3'D4 $\Delta 30$. Se confirmó que la secuencia de la UTR 3' y la unión de NS5 eran correctas.

Para generar p3-3'D4, se introdujeron los 30 nucleótidos delecionados de la mutación por delección $\Delta 30$ en el subclón p3-frag.4-3'D4 $\Delta 30$. Brevemente, el fragmento *MluI-KpnI* de p3-frag.4-3'D4 $\Delta 30$, que abarca la región $\Delta 30$, se reemplazó con el fragmento correspondiente de p4 para crear el plásmido p3-frag.4-3'D4. Para generar un genoma p3 de longitud completa, el fragmento *PstI-KpnI* de p3 se reemplazó con el fragmento correspondiente de p3-frag.4-3'D4. Se determinó que la secuencia de la UTR-3' del plásmido p3-3'D4 era correcta y que contenía los 30 nt que faltaban de la mutación $\Delta 30$.

Para la recuperación de virus, se sintetizaron *in vitro* transcritos de ARN con caperuza (*capped*) en el extremo 5' de plásmidos de ADNc y se transfectaron en células Vero o en células C6/36. Antes de la transcripción y generación de virus infecciosos, las secuencias enlazadoras se retiraron de los plásmidos de ADNc por digestión con *SpeI*. Después los plásmidos se recircularizaron por ligamiento, se linealizaron con *Acc651* (isoesquizómero de *KpnI* que escinde dejando únicamente un solo nucleótido en 3') y se transcribieron *in vitro* usando polimerasa SP6. Después los transcritos purificados se transfectaron en células Vero o C6/36.

rDEN3-3'D4 se recuperó en células C6/36 y en células Vero, mientras que rDEN3-3'D4 $\Delta 30$ solo pudo recuperarse en células Vero. Después, los virus mutantes se pasaron una vez en células Vero seguido de clonación biológica mediante dos diluciones terminales en células Vero. Después rDEN3-3'D4 y rDEN3-3'D4 $\Delta 30$ se pasaron cuatro o seis veces en células Vero, respectivamente. Se descubrió que la secuencia genética de la unión NS5 - UTR-3' y de la UTR-3' eran correctas para rDEN3-3'D4 y rDEN3-3'D4 $\Delta 30$. Por lo tanto, ambos virus se estudiaron posteriormente.

60 También se identificaron mutaciones en los virus rDEN3-3'D4 $\Delta 30$ en comparación con el clon de ADNc plasmídico DEN3 p3 (UTR-5' y genes) y con el clon de ADNc DEN4 p4 (UTR-3') (Tabla 5).

Tabla 5. Mutaciones en el virus rDEN3-3'D4Δ30 en comparación con el clon de ADNc plasmídico DEN3 p3 (UTR-5' y genes) y con el clon de ADNc DEN4 p4 (UTR-3')

Virus	Gen	Posición de nucleótido	Sustitución de nucleótido	Posición de aminoácido	Cambio de aminoácido
rDEN3-3'D4Δ30	C	250	U → C	52	<i>silencioso</i>
	NS3	5899	U → U	462	<i>silencioso</i>
rDEN3Δ86	NS4B ^a	512	U → C	115	Val → Ala
	UTR-3'	10534	A → G	-	

^a La mutación 7164 es una mutación por adaptación de células Vero que se modificó por ingeniería genética en la construcción de ADNc.

Replicación de virus mutantes DEN3 en ratones SCID-HuH-7

5 Los cuatro virus mutantes por delección (rDEN3Δ30/31, rDEN3Δ61, rDEN3Δ80, y rDEN3Δ86), que se descubrió que se replicaban a un alto título en células Vero y que se confirmó que tenían la secuencia UTR-3' correcta, y los virus rDEN3-3'-D4 y rDEN3-3'-D4Δ30, se evaluaron primero en ratones SCID-HuH-7. Para determinar el efecto sobre la replicación de la quimerización de la UTR-3' y sobre cualquier atenuación adicional conferida por la mutación Δ30, se compararon rDEN3-3'-D4 y rDEN3-3'-D4Δ30. Los ratones SCID-HuH-7 contienen tumores sólidos de la línea celular de hepatoma humano HuH-7, y el análisis de la replicación de virus en este modelo de ratón sirve como un sustituto para la replicación del virus DEN en el hígado humano. Numerosos virus mutantes del virus DEN se han identificado por evaluación en ratones SCID-HuH-7 Blaney JE *et al.* 2002 *Virology* 300: 125-139; Hanley *et al.* 2004 *Vaccine* 22: 3440-3448; Blaney JE *et al.* 2006 *Viral Immunol.* 19: 10-32). Este modelo de ratón proporciona la prueba original de que el virus rDEN3Δ30 no se atenuó en comparación con el virus parental rDEN3, mientras que el virus quimérico antigénico, rDEN3/4Δ30, estaba aproximadamente 100 veces limitado en la replicación en los ratones SCID-HuH-7 cuando se comparó con virus parentales de tipo silvestre (Blaney JE *et al.* 2004 *Am J Trop Med Hyg* 71: 811 -821).

20 Para el análisis de la replicación de virus en ratones SCID-HuH-7, ratones SCID (Tac:lcr:Ha(ICR)-*Prkdc*^{scid}) (Taconic Farms) de cuatro a seis semanas de vida, recibieron inyección intraperitoneal con solución salina tamponada con fosfato 0,1 ml que contenía 10⁷ células HuH-7 que se habían propagado en cultivo tisular. Los tumores se detectaron en el peritoneo, de cinco a seis semanas después del trasplante, y los ratones portadores de tumor se infectaron por inoculación directa en el tumor con 10⁴ UFP de virus en 50 μl de Opti-MEM 1. El día 7 después de la infección se recogió suero de los ratones infectados y se congeló a -80 °C. El título del virus se determinó mediante ensayo en placa en células Vero.

30 Como se indica en la Tabla 6, la cepa Sleman/78 de DEN3 de tipo silvestre se replicó a un título de virus promedio máximo de casi 10^{6,9} UFP/ml. Aunque se observó un nivel de replicación disminuido en cada uno de los seis virus mutantes, las diferencias en la replicación no fueron estadísticamente significativas. Sin embargo, rDEN3Δ86 y rDEN3-3'D4Δ30 estaban más de 10 veces limitados en cuanto a la replicación en comparación con el virus DEN3 de tipo silvestre, aunque la replicación de rDEN3Δ30/31 estaba ligeramente menos de 10 veces limitada. Basándose en este límite arbitrario, se seleccionaron tres virus para evaluación adicional. Es importante observar que se descubrió que el virus rDEN4Δ30, que tiene un fenotipo bien caracterizado, atenuado y no reactogénico en seres humanos, estaba solo 6 veces limitado en cuanto a la replicación en ratones SCID-HuH-7 en comparación con el virus rDEN4 de tipo silvestre (Hanley *et al.* 2004 *Vaccine* 22: 3440-3448).

Tabla 6. Replicación de virus DEN3 mutantes en ratones HuH-7-SCID.

Virus ¹	N.º de ratones	Título de virus promedio máximo (log ₁₀ ufp/ml ± DT)	Reducción en veces en comparación con DEN 3 (Sleman/78)
DEN3 (Sleman/78)	8	6,9 ± 0,1	-
rDEN3Δ30/31	8	6,0 ± 0,3	8
rDEN3Δ61	9	6,3 ± 0,2	4
rDEN3Δ80	9	6,3 ± 0,3	4
rDEN3Δ86	10	5,6 ± 0,4	20
rDEN3-3'D4	11	6,5 ± 0,4	3
rDEN3-3'D4Δ30	9	5,7 ± 0,2	16

¹ Grupos de ratones HuH-7-SCID se inocularon en el tumor con 4,0 log₁₀ UFP del virus indicado. El suero se recogió el día 7 y el título del virus se determinó en células Vero.

40 Dado que el virus rDEN3-3'D4Δ30 y los virus rDEN3Δ30/31 y rDEN3Δ86 codifican el conjunto completo de proteínas estructurales y no estructurales de DEN3, podría esperarse que indujeran el complemento completo de inmunidad humoral y celular. Esta inducción inmunitaria más completa sería ventajosa en comparación con la inducida por el rDEN3/4A30 quimérico, que solo codifica las proteínas estructurales de DEN3.

Replicación de virus mutantes DEN3 en cultivo tisular

El nivel de replicación de virus en células Vero y en células C6/36 de mosquito se evaluó para los virus mutantes por delección DEN3 Δ 30/31 y rDEN3 Δ 86 y para los virus rDEN3-3'D4 con y sin Δ 30. Se analizó la replicación en células Vero porque estas células son el sustrato para la fabricación, mientras que el crecimiento en células C6/36 se evaluó porque los fenotipos atenuantes en estas células de mosquito pueden asociarse con una replicación restringida en el mosquito *Aedes* que sirve como el vector para la transmisión del virus DEN (Hanley *et al.* 2003 *Virology* 312: 222-232).

Las cinéticas de crecimiento se evaluaron de la siguiente manera. Monocapas confluentes de células Vero y de células C6/36 en matraces de 75 cm² se infectaron a una multiplicidad de infección de 0,01. Se retiraron partes alícuotas de 0,5 ml de sobrenadante de cultivo tisular diariamente durante siete días, se combinaron con estabilizador SPG, y se congelaron a -80 °C. El título de los virus de todas las muestras se determinó mediante ensayo en placa en células Vero. El límite de detección para el ensayo en placa es de 1,0 log₁₀ UFP/ml.

La cinética de replicación de cada virus en ambas líneas de células se muestra en la Figura 19. En células Vero, rDEN3 Δ 30/31, rDEN3 Δ 86 y rDEN3-3'D4 Δ 30 se replicaron a un nivel máximo que se aproximó al de rDEN3 de tipo silvestre y con cinéticas similares a las de rDEN3 de tipo silvestre. Estos tres componentes de vacuna alcanzaron títulos máximos de virus de 6,5 a 6,7 log₁₀ UFP/ml, lo que demuestra la viabilidad de fabricar cada uno de estos virus. En células Vero, el virus rDEN3-3'D4 se replicó a un título máximo de 7,8 log₁₀ UFP/ml que es casi 100 veces mayor que el observado para rDEN3 de tipo silvestre, lo que indica que la inclusión de la UTR-3' de DEN4 puede aumentar la replicación en células Vero. Esto también podría atribuirse a una adaptación más eficaz en células Vero del virus rDEN3-3'D4. rDEN4 se replica a un título máximo de aproximadamente 8,0 log₁₀ UFP/ml, lo que indica que el virus quimérico alcanza un título máximo que no supera el de cualquiera de sus virus parentales (Blaney JE *et al.* 2006 *Viral Immunol.* 19: 10-32).

El análisis de replicación de virus en células C6/36 demostró que rDEN3 Δ 86 y rDEN3-3'D4 Δ 30 alcanzaron títulos máximos aproximadamente 10 veces menores que el títulos de virus máximo del virus rDEN3 de tipo silvestre, 6,9 log₁₀ UFP/ml (Figura 19). El virus rDEN3-3'D4 se replicó a un título máximo similar al observado para rDEN3 de tipo silvestre. El resultado más sorprendente fue la ausencia de replicación observada en células C6/36 para el virus rDEN3 Δ 30/31. Después del día 1, el virus no se detectó en el medio de cultivo de células C6/36 infectadas con virus rDEN3 Δ 30/31 a pesar de la replicación eficaz observada en células Vero. Estos resultados se confirmaron en un segundo experimento de curva de crecimiento independiente e indican un fenotipo atenuante en una gama de huéspedes en cultivo tisular que se contempla como que viene acompañada por un fenotipo atenuante también en mosquitos.

Replicación e inmunogenicidad de virus mutantes DEN3 en monos rhesus

Basándose en la ligera atenuación en ratones SCID-HuH-7 y en el crecimiento eficaz en células Vero, se evaluaron los virus rDEN3 Δ 30/31, rDEN3 Δ 86 y rDEN3-3'D4 Δ 30 en monos Rhesus. Los virus mutantes se compararon con DEN3 de tipo silvestre con respecto al nivel y a la duración de la viremia, a la inducción de anticuerpos neutralizantes, y a la capacidad de conferir protección frente a la exposición al virus DEN3 de tipo silvestre. El virus rDEN3-3'D4 también se evaluó para diferenciar la contribución de la quimerización de la UTR-3' después la atenuación con y sin la mutación Δ 30. Un fenotipo atenuante en monos Rhesus ha sido generalmente un fuerte indicador de seguridad para componentes de vacuna en ensayos clínicos incluyendo rDEN4 Δ 30, rDEN1 Δ 30 y rDEN2/4 Δ 30 (Blaney JE *et al.* 2006 *Viral Immunol.* 19: 10-32).

Grupos de cuatro monos Rhesus se inocularon por vía subcutánea con 10⁵ UFP de los virus indicados (Tabla 7). Dos monos se infectaron de manera simulada con diluyente de virus. Para la detección de la viremia, se recogió suero los días 0-8 y el día 10 y se congeló a -80 °C. El título del virus de muestras de suero se determinó mediante ensayo en placa en células Vero. El suero se recogió el día 28 para la detección de anticuerpos neutralizantes dirigidos contra DEN3. Los niveles de anticuerpos neutralizantes se determinaron usando un ensayo de neutralización de reducción de placas en células Vero frente al virus DEN3 de tipo silvestre. El día 35 después de la infección, todos los monos estaban expuestos por infección subcutánea con 10⁵ UFC de virus de tipo silvestre DEN3. El suero se recogió los días 0-8 y el día 10 y se congeló a -80 °C. El título del virus en las muestras de suero se determinó mediante ensayo en placa en células Vero.

Tabla 7. Replicación e inmunogenicidad de virus mutantes rDEN3 en monos rhesus

Virus ¹	N.º de monos con viremia	% de monos con viremia	N.º medio de días víremicos por mono	Título de virus promedio máximo ² (log ₁₀ uftp/ml ± DT)	Media geométrica título de anticuerpo neutralizante en suero (dilución recíproca) ³		% de monos con viremia	Título de virus promedio máximo ² (log ₁₀ uftp/ml ± DT)
					Día 0	Día 28		
DEN3 (Steman/78)	4	100	3,5	1,8 ± 0,1	< 5	253	0	< 1,0
rDEN3Δ30/31	4	0	0	< 1,0	< 5	304	0	< 1,0
rDEN3Δ86	4	0	0	< 1,0	< 5	224	0	< 1,0
rDEN3-3'D4	4	75	1,5	1,3 ± 0,2	< 5	229	0	< 1,0
rDEN3-3'D4Δ30	4	0	0	< 1,0	< 5	77	0	< 1,0
Infectados de manera simulada	2	0	0	< 1,0	< 5	< 5	100	1,8 ± 0,2

¹ Los grupos de monos rhesus se inocularon por vía subcutánea el día 0 con 5,0 log₁₀ UFP de los virus indicados a una dosis 1 ml. El suero se recogió a diario los días 0 - 8 y 10 y una vez el día 28.

² El título del virus en suero se determinó mediante ensayo en placa en células Vero.

³ Los títulos de anticuerpos neutralizantes por reducción de placa (60 %) se determinaron usando DEN3 (Steman/78).

⁴ Los monos se expusieron después de 35 días con DEN3 (Steman/78) administrados por vía subcutánea a una dosis de 1 ml que contenía 5,0 log₁₀ UFP. El suero se recogió diariamente los días 0 - 8 y 10.

El virus de la cepa Sleman/78 de DEN3 de tipo silvestre se replicó en monos rhesus a un título de virus promedio máximo de $1,8 \log_{10}$ UFP/ml de suero con todos los monos que desarrollaron viremia (Tabla 7). Estos resultados son paralelos a estudios previos de DEN3 en monos rhesus (Blaney JE *et al.* 2004 Am J Trop Med Hyg 71: 811-821). No se detectó viremia en ningún mono infectado con cualquiera de los tres componentes de vacuna, rDEN3 Δ 30/31, rDEN3 Δ 86, o rDEN3-3'D4 Δ 30 lo que demuestra un claro fenotipo atenuante para cada uno de estos virus en monos rhesus. Cabe destacar que el virus rDEN3-3'D4 se detectó en el 75 % de los monos con un título de virus promedio máximo de $1,3 \log_{10}$ UFP/ml de suero lo que sugiere que la presencia de la mutación Δ 30 es crítica para la atenuación del virus quimérico UTR-3'. A pesar de la ausencia de viremia detectable, los niveles medios de anticuerpos neutralizantes en monos infectados con rDEN3 Δ 30/31 y rDEN3 Δ 86 alcanzaron niveles similares a los del virus DEN3 de tipo silvestre, 1:253 (Tabla 7). En cambio, el virus rDEN3-3'D4 Δ 30 indujo niveles medios de anticuerpos neutralizantes aproximadamente tres veces más bajos que DEN3. Sin embargo, después de la infección, el 100 % de los monos se inmunizó con cada componente de vacuna seroconvertido como se define por un aumento de cuatro veces o mayor en los niveles de anticuerpos neutralizantes en suero. Por tanto se consideró que todos los monos estaban infectados con cada uno de los componentes de la vacuna a pesar de la ausencia de viremia detectable. La determinación del título de virus en suero después de la exposición con virus DEN3 indica que la inmunización con cada uno de los componentes de la vacuna indujo una protección completa de viremia detectable como podría esperarse dados los niveles observados de anticuerpos neutralizantes.

Replicación en mosquitos

La replicación de rDEN3 y rDEN3 Δ 30/31 se estudió en mosquitos *Toxorhynchites amboinensis*. Se realizó inoculación intratorácica de diluciones en serie con factor diez del virus de ensayo como se ha descrito anteriormente (Troyer J.M. e al. 2001 Am. J. Trop. Med. Hyg. 65: 414-9). Después de una incubación de 14 días, las cabezas se separaron y se homogeneizaron en diluyente. Se determinó el título de los virus en los homogeneizados de las cabezas mediante ensayo en placa en células Vero.

Basándose en la atenuación de rDEN3 Δ 30/31 en monos rhesus y en su replicación restringida en células de mosquito C6/36, rDEN3 Δ 30/31 se comparó con rDEN3 de tipo silvestre con respecto a la infectividad y al nivel de replicación en mosquitos *Toxorhynchites amboinensis* altamente sensibles (Tabla 8). Se inocularon diluciones en serie con factor diez por vía intratorácica y se evaluó la capacidad para infectar tejidos de la cabeza realizando un ensayo en placa en homogeneizados de cabezas de mosquito después de una incubación de 14 días. La infectividad de rDEN3 y de rDEN3 Δ 30/31 fue muy similar ya que la dosis infecciosa del mosquito al 50 % fue de aproximadamente $10^{1.3}$ UPF en ambos virus (Tabla 8). Sin embargo, el nivel de replicación de rDEN3 Δ 30/31 en las cabezas de los mosquitos infectados se redujo de 5 a 50 veces aproximadamente. Esta reducción fue significativa a las dosis ensayadas de $10^{2.3}$ y $10^{1.3}$ UPF. Este hallazgo indica que aunque rDEN3 Δ 30/31 tiene infectividad por *Toxorhynchites* mediante infección intratorácica similar a la de rDEN3 de tipo silvestre, hay una restricción estadísticamente significativa en el nivel de replicación en mosquitos permitida por la mutación Δ 30/31.

Tabla 8. Replicación de rDEN3 y rDEN3 Δ 30/31 en *Toxorhynchites amboinensis*

Virus	Dosis ^a (\log_{10} UFP)	No ensayado	% infectado ^b	Título de virus promedio ^c (\log_{10} UFP/cabeza)	Reducción (\log_{10}) en comparación con la misma dosis de virus ts
rDEN3 ts	2,3	20	90	$4,2 \pm 0,1^d$	
	1,3	19	53	$4,2 \pm 0,1^e$	
	0,3	17	18	$4,3 \pm 0,3$	
rDEN3 Δ 30/ 31	2,3	12	83	$2,7 \pm 0,3^d$	1,5
	1,3	16	44	$3,1 \pm 0,3^e$	1,1
	0,3	8	13	$3,6 \pm 0,0$	0,7

^a Título de virus administrado por vía intratorácica en un inóculo de 0,2 μ l.

^b EL porcentaje de mosquitos con virus detectable el día 14 después de la inoculación se determinó mediante ensayo en placa en homogeneizados de cabeza de mosquito en células Vero.

^c Calculado usando solo valores de cabezas positivas a virus.

^d Para una dosis de $10^{2.3}$ UPF de rDEN3 y de rDEN3 Δ 30/31, los títulos de virus promedio fueron significativamente diferentes determinado por un ensayo post-hoc de Tukey-Kramer ($P < 0,001$).

^e Para una dosis de $10^{1.3}$ UPF de rDEN3 y de rDEN3 Δ 30/31, los títulos de virus promedio fueron significativamente diferentes determinado por un ensayo post-hoc de Tukey-Kramer ($P < 0,005$).

ARTÍCULOS:

1. Un virus del dengue o virus quimérico del dengue que comprende una mutación en la región no traducida 3' (UTR-3') seleccionada del grupo que consiste en:

(a) una mutación $\Delta 30$ que retira la estructura homóloga TL-2 en cada uno de los serotipos 1, 2, 3 y 4 del virus del dengue y nucleótidos adicionales a la mutación $\Delta 30$ delecionados de la UTR 3' que retira la secuencia en la dirección 5' hasta el límite 5' de la estructura homóloga TL-3 en cada uno de los serotipos 1, 2, 3 y 4 del virus del dengue; y

(b) un reemplazo de la UTR-3' de un virus del dengue de un primer serotipo con la UTR-3' de un virus del dengue de un segundo serotipo, que opcionalmente contiene la mutación $\Delta 30$ y nucleótidos adicionales a la mutación $\Delta 30$ delecionados de la UTR-3'.

2. El virus del dengue o virus del dengue quimérico del artículo 1 en el que la mutación es (a).

3. El virus del dengue o virus del dengue quimérico del artículo 2 en el que la mutación retira la estructura homóloga TL-2 y retira la secuencia hasta e incluyendo la estructura homóloga TL-3 de una manera contigua a la mutación $\Delta 30$.

4. El virus del dengue o virus del dengue quimérico del artículo 3 en el que la mutación es la mutación $\Delta 86$, de tal manera que la mutación $\Delta 30$ deleciona nt de aproximadamente 228 a aproximadamente 145 de DEN1, nt de aproximadamente 228 a aproximadamente 144 de DEN2, nt de aproximadamente 228 a aproximadamente 143 de DEN3 y nt de aproximadamente 228 a aproximadamente 143 de DEN4, designados con el sistema de numeración inverso.

5. El virus del dengue o virus del dengue quimérico del artículo 4 en el que el serotipo es DEN3.

6. El virus del dengue o virus del dengue quimérico del artículo 2 en el que la mutación retira tanto la estructura homóloga TL-2 como la estructura homóloga TL-3 de una manera no contigua a la mutación $\Delta 30$.

7. El virus del dengue o virus del dengue quimérico del artículo 6 en el que la mutación es la mutación $\Delta 30/31$, de tal manera que la mutación $\Delta 30$ deleciona nt de aproximadamente 174 a aproximadamente 145 de DEN1, nt de aproximadamente 173 a aproximadamente 144 de DEN 2, nt de aproximadamente 173 a aproximadamente 143 de DEN3, y nt de aproximadamente 172 a aproximadamente 143 de DEN4, designados con el sistema de numeración inversa, y la mutación $\Delta 31$ deleciona nt de aproximadamente 258 a aproximadamente 228 de DEN1, nt de aproximadamente 258 a aproximadamente 228 de DEN 2, nt de aproximadamente 258 a aproximadamente 228 de DEN3, y nt de aproximadamente 258 a aproximadamente 228 de DEN4, designados con el sistema de numeración inversa.

8. El virus del dengue o virus del dengue quimérico del artículo 7 en el que el serotipo es DEN3.

9. El virus del dengue o virus del dengue quimérico del artículo 1 en el que la mutación es (b).

10. El virus del dengue o virus del dengue quimérico del artículo 9 en el que la UTR-3' de DEN1 se reemplaza con la UTR-3' de los serotipos 2, 3 o 4 del virus del dengue, la UTR-3' de DEN2 se reemplaza con la UTR-3' de los serotipos 1, 2, 3 o 4 del virus del dengue, la UTR-3' de DEN3 se reemplaza con la UTR-3' de los serotipos 1, 2 o 4 del virus del dengue o la UTR-3' de DEN4 se reemplaza con la UTR-3' de los serotipos 1, 2 o 3 del virus del dengue.

11. El virus del dengue o virus del dengue quimérico del artículo 10 que adicionalmente comprende la mutación $\Delta 30$.

12. El virus del dengue o virus del dengue quimérico del artículo 10 que adicionalmente comprende la mutación $\Delta 30$ y nucleótidos adicionales en la mutación $\Delta 30$ delecionados de la UTR-3'.

13. El virus del dengue o virus del dengue quimérico del artículo 9 en el que la UTR-3' de DEN3 se reemplaza con la UTR-3' de los serotipos 1, 2 o 4 del virus del dengue.

14. El virus del dengue o virus del dengue quimérico del artículo 13 que adicionalmente comprende la mutación $\Delta 30$.

15. El virus del dengue o virus del dengue quimérico del artículo 13 que adicionalmente comprende la mutación $\Delta 30$ y los nucleótidos adicionales en la mutación $\Delta 30$ delecionados de la UTR-3'.

16. El virus del dengue o virus del dengue quimérico del artículo 9 seleccionado del grupo que consiste en:

a) rDEN1-3'D2, rDEN1-3'D2x, rDEN1-3'D3, rDEN1-3'D3x, rDEN1-3'D4, rDEN1-3'D4x;
rDEN1/2-3'D1, rDEN1/2-3'D1x, rDEN1/2-3'D3, rDEN1/2-3'D3x, rDEN1/2-3'D4, rDEN1/2-3'D4x;
rDEN1/3-3'D1, rDEN1/3-3'D1x, rDEN1/3-3'D2, rDEN1/3-3'D2x, rDEN1/3-3'D4, rDEN1/3-3'D4x;
rDEN1/4-3'D1, rDEN1/4-3'D1x, rDEN1/4-3'D2, rDEN1/4-3'D2x, rDEN1/4-3'D3, rDEN1/4-3'D3x;

b) rDEN2-3'D1, rDEN2-3'D1x, rDEN2-3'D3, rDEN2-3'D3x, rDEN2-3'D4, rDEN2-3'D4x;
rDEN2/1-3'D2, rDEN2/1-3'D2x, rDEN2/1-3'D3, rDEN2/1-3'D3x, rDEN2/1-3'D4, rDEN2/1-3'D4x;
rDEN2/3-3'D1, rDEN2/3-3'D1x, rDEN2/3-3'D2, rDEN2/3-3'D2x, rDEN2/3-3'D4, rDEN2/3-3'D4x;
rDEN2/4-3'D1, rDEN2/4-3'D1x, rDEN2/4-3'D2, rDEN2/4-3'D2x, rDEN2/4-3'D3, rDEN2/4-3'D3x;

c) rDEN3-3'D1, rDEN3-3'D1x, rDEN3-3'D2, rDEN3-3'D2x, rDEN3-3'D4, rDEN3-3'D4x;
rDEN3/1-3'D2, rDEN3/1-3'D2x, rDEN3/1-3'D3, rDEN3/1-3'D3x, rDEN3/1-3'D4, rDEN3/1-3'D4x;
rDEN3/2-3'D1, rDEN3/2-3'D1x, rDEN3/2-3'D3, rDEN3/2-3'D3x, rDEN3/2-3'D4, rDEN3/2-3'D4x;
rDEN3/4-3'D1, rDEN3/4-3'D1x, rDEN3/4-3'D2, rDEN3/4-3'D2x, rDEN3/4-3'D3, rDEN3/4-3'D3x; y

d) rDEN4-3'D1, rDEN4-3'D1x, rDEN4-3'D2, rDEN4-3'D2x, rDEN4-3'D3, rDEN4-3'D3x;
rDEN4/1-3'D2, rDEN4/1-3'D2x, rDEN4/1-3'D3, rDEN4/1-3'D3x, rDEN4/1-3'D4, rDEN4/1-3'D4x;
rDEN4/2-3'D1, rDEN4/2-3'D1x, rDEN4/2-3'D3, rDEN4/2-3'D3x, rDEN4/2-3'D4, rDEN4/2-3'D4x;
rDEN4/3-3'D1, rDEN4/3-3'D1x, rDEN4/3-3'D2, rDEN4/3-3'D2x, rDEN4/3-3'D4, rDEN4/3-3'D4x;

en el que x es una mutación indicada en la Tabla 2.

17. Una composición inmunogénica que comprende un virus del dengue o virus quimérico del dengue de acuerdo con cualquiera de los artículos 1-16.

18. La composición inmunogénica del artículo 17 que es tetravalente para los serotipos 1, 2, 3 y 4 del dengue.

5 19. Un método de inducción de una respuesta inmunitaria contra un virus del dengue en un paciente que comprende administrar a un paciente la composición inmunogénica del artículo 17 para inducir una respuesta inmunitaria contra un virus del dengue.

20. Un método de producción de un virus del dengue o virus del dengue quimérico que comprende introducir una mutación en la región no traducida 3' (UTR-3') seleccionada del grupo que consiste en:

10 (a) una mutación $\Delta 30$ que retira la estructura homóloga TL-2 en cada uno de los serotipos 1, 2, 3 y 4 del virus del dengue y nucleótidos adicionales a la mutación $\Delta 30$ delecionados de la UTR-3' que retira la secuencia en la dirección 5' hasta el límite 5' de la estructura homóloga TL-3 en cada uno de los serotipos 1, 2, 3 y 4 del virus del dengue; y

15 (b) un reemplazo de la UTR-3' de un virus del dengue de un primer serotipo con la UTR-3' de un virus del dengue de un segundo serotipo, que opcionalmente contiene la mutación $\Delta 30$ y nucleótidos adicionales a la mutación $\Delta 30$ delecionados de la UTR-3'.

20 LISTADO SE SECUENCIAS

<110> El Gobierno de los Estados Unidos de América, representado por la secretaría del Departamento de Salud y Servicios Humanos
Whitehead, Stephen S.
Blaney, Joseph E.
25 Murphy, Brian R.

<120> DESARROLLO DE COMPONENTES DE LA VACUNA DEL VIRUS DEL DENGUE

30 <130> NIH343.001VPC

<150> US 60/837,723

<151> 15-08-2006

35 <160> 33

<170> FastSEQ para Windows versión 4.0

40 <210> 1

<211> 276

<212> ADN

<213> Virus del dengue

45 <400> 1

```

uaaaaccugg gaggcugcaa acuguggaag cuguacgcac gguguagcag acuagcgguu 60
agaggagacc ccucccauga cacaacgcag cagcggggcc cgagcucuga gggaagcugu 120
accuccuugc aaaggacuag agguuagagg agaccccccg caaauaaaaa cagcauauug 180
acgcuggggag agaccagaga uccugcuguc uccucagcau cauuccaggc acagaacgcc 240
agaaaauugga auggugcugu ugaaucaaca gguucu 276
    
```

50 <210> 2

<211> 278

<212> ADN

<213> Virus del dengue

<400> 2

```

uaaaaacccg ggaggcugca aaccauggaa gcuguacgca ugggguagca gacuaguggu 60
uagaggagac cccucccaag acacaacgca gcagcggggc ccaacaccag gggaagcugu 120
accugggugg uaaggacuag agguuagagg agaccccccg cacaacaaca aacagcauu 180
ugacgcuggg agagaccaga gauccugcug ucucuacagc aucauuccag gcacagaacg 240
ccagaaaaug gaauggugcu guugaaucaa cagguucu 278
    
```

55

<210> 3

ES 2 585 553 T3

<211> 281
 <212> ADN
 <213> Virus del dengue

5 <400> 3

```

uaaaaaaucc gggaggccac aaaccaugga agcuguaacgc auggcguagu ggacuagcgg 60
uuagaggaga cccucuccuu acagaucgca gcaacaauagg gggccaagg ugagauaag 120
cuguagucuc acuggaagga cuagagguua gaggagacc cccaaaaca aaaaacagca 180
uauugacgcu gggaaagacc agagauccug cugucuccuc agcaucauuc caggcacagg 240
acgccagaaa auggaauugu gcuguugaau caacagguuc u 281
    
```

<210> 4
 <211> 276
 <212> ADN
 <213> Virus del dengue

10

<400> 4

15

```

uaaaaccugg gaggcugcaa acuguggaag cuguacgcac gguguagcag acuagcgguu 60
agaggagacc ccucccauga cacaacgcag cagcggggcc cgagcucuga gggaaugcu 120
accuccuugc aaaggacuag agguuagagg agaccccccg caaaiaaaaa cagcauuuug 180
acgcugggag agaccagaga uccugcuguc uccucagcau cauuccaggc acagaacgcc 240
agaaaaugga auggugcugu ugaaucaaca gguucu 276
    
```

<210> 5
 <211> 281
 <212> ADN
 <213> Virus del dengue

20

<400> 5

25

```

auccccaggg aggccaugcg ccacggaagc uguacgcgug gcatauugga cuagcgguaa 60
gaggagacc cucccaucac ugacaaaacg cagcaaaagg gggcccgaag ccaggaggaa 120
gcuguacucc ugguggaagg acuagagguu agaggagacc cccccaacac aaaaacagca 180
uauugacgcu gggaaagacc agagauccug cugucucugc aacaucauuc caggcacaga 240
gcgccgcaag auggauuggu guuguugauc caacagguuc u 281
    
```

<210> 6
 <211> 248
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> Construcción del virus del dengue

35

<400> 6

```

uaaaaacccg ggaggcugca aaccauggaa gcuguacgca ugggguagca gacuaguggu 60
uagaggagac cccucccaag acacaacgca gcagcggggc ccaagacuag agguuagagg 120
agaccccccg cacaacaata aacagcauau ugacgcuggg agagaccaga gaucucugcu 180
ucucuacagc aucauuccag gcacagaacg ccagaaaauug gaauggugcu guugaaucaa 240
cagguucu . 248
    
```

<210> 7
 <211> 251
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> Construcción del virus del dengue

45

<400> 7

ES 2 585 553 T3

uaaaaaucc gggaggccac aaaccaugga agcuguacgc auggcguagu ggacuagcgg 60
uuagaggaga ccccuccuu acagaucgca gcaacaauagg gggcccaaga cuagagguua 120
gaggagacc ccccaaaaaca aaaaacagca uauugacgcu gggaaagacc agagauccug 180
cugucuccuc agcaucauuc caggcacagg acgccagaaa auggaauuggu gcuguugaau 240
caacagguuc u 251

5 <210> 8
 <211> 245
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Construcción del virus del dengue

<400> 8

uaaaaccugg gaggcugcaa acuguggaag cuguacgcac gguguagcag acuagcgguu 60
agaggagacc ccuuccauga cacaacgcag cagcggggcc caagacuaga gguuagagga 120
gacccccgc aaauaaaaac agcauuuuga cgcugggaga gaccagagau ccugcugucu 180
ccucagcauc auuccaggca cagaacgcc aaaaauggaa uggugcuguu gaaucaacag 240
guucu 245

15 <210> 9
 <211> 250
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Construcción del virus del dengue

<400> 9

25 **auccccaggg aggccaugcg ccacggaagc uguacgcgug gcuuuuugga cuagcgguuu 60**
gaggagacc cucccaucac ugacaaaacg cagcaaaagg gggcccaaga cuagagguua 120
gaggagacc cccaacaca aaaacagcau auugacgcug ggaaagacca gagauccugc 180
ugucucugca acaucaaucc aggcacagag cgccgcaaga uggauuggug uuguugauc 240
aacagguucu 250

30 <210> 10
 <211> 217
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Construcción del virus del dengue

<400> 10

uaaaaaaccg ggaggcugca acuagugguu agaggagacc ccucccaaga cacaacgcag 60
cagcggggcc caagacuaga gguuagagga gacccccgc acaacaaca acagcauuu 120
gacgcuggga gagaccagag auccugcugu cucuacagca ucauuccagg cacagaacgc 180
cagaaaaugg auggugcug uugaaucaac agguucu 217

40 <210> 11
 <211> 220
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Construcción del virus del dengue

<400> 11

50

ES 2 585 553 T3

uaaaaaucc gggaggccac aaauagcggu uagaggagac cccucccuua cagaucgcag 60
caacaauagg ggcccaagac uagagguuag aggagacccc cccaaaacaa aaaacagcau 120
auugacgcug ggaaagacca gagauccugc ugucuccuca gcaucauucc aggcacagga 180
cgccagaaaa uggaauaggug cuguugaauc aacagguucu 220

5 <210> 12
 <211> 214
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Construcción del virus del dengue
 <400> 12

uaaaaccugg gaggcugcga cuagcgguaa gaggagacc cucccaugac acaacgcagc 60
agcggggccc aagacuagag guuagaggag acccccgcga aauaaaaaca gcauauugac 120
gcugggagag accagagauc cugcugucuc cucagcauca uuccaggcac agaacgccag 180
aaaauggau ggugcuguug aaucaacagg uucu 214

15 <210> 13
 <211> 219
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Construcción del virus del dengue
 <400> 13

25 **auccccaggg aggccaugcg ccacgguuag aggagacccc ucccaucacu gacaaaacgc 60**
agcaaaaggg ggcccaagac uagagguuag aggagacccc cccaacacaa aaacagcaua 120
uugacgcugg gaaagaccag agauccugcu gucucugcaa caucaaucca ggcacagagc 180
gccgcaagau ggauuggugu uguugaucca acagguucu 219

30 <210> 14
 <211> 194
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Construcción del virus del dengue
 <400> 14

uaaaaacccg ggaggcugca aaccauggaa gcuguacgca ugggguagca gacuagaggu 60
uagaggagac cccccgcaca acaacaacaa gcauauugac gcugggagag accagagauc 120
cugcugucuc uacagcauca uuccaggcac agaacgccag aaaauggau ggugcuguug 180
aaucaacagg uucu 194

40 <210> 15
 <211> 196
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Construcción del virus del dengue
 <400> 15

ES 2 585 553 T3

uaaaaaucc gggaggccac aaaccaugga agcuguacgc auggcguagu ggagacuaga 60
gguuagagga gaccccccca aaacaaaaaa cagcauuug acgcugggaa agaccagaga 120
uccugcuguc uccucagcau cauuccaggc acaggacgcc agaaaaugga auggugcugu 180
ugaaucaaca gguucu 196

5 <210> 16
 <211> 190
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Construcción del virus del dengue
 <400> 16

uaaaaccugg gaggcugcaa acuguggaag cuguacgcac gguguagcga cuagagguua 60
gaggagaccc cccgcaaaua aaaacagcau auugacgcug ggagagacca gagauccugc 120
ugucuccuca gcaucauucc aggcacagaa cgccagaaaa uggaauggug cuguugaauc 180
aacagguucu 190

15 <210> 17
 <211> 195
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Construcción del virus del dengue
 <400> 17

aucuccaggg aggccaugcg ccacggaagc uguacgcgug gcauuuugga cuagacuaga 60
gguuagagga gaccccccca acacaaaaac agcauuuuga cgcugggaaa gaccagagau 120
ccugcugucu cugcaauc aauccaggca cagagcgccg caagauggau ugguguuguu 180
gauccaacag guucu 195

25 <210> 18
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Región de unión
 35 <400> 18

gaggagcca fttgtaaac gtaggaagtg aaaaagagg 39

40 <210> 19
 <211> 5
 <212> PTR
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Región de unión
 <400> 19

Glu Gly Ala Ile Trp
1 5

50 <210> 20
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55

ES 2 585 553 T3

<220>
<223> Región de unión

5 <400> 20
agtgaaggag ttctgtaatt accaacaaca aacaccaaa 39

10 <210> 21
<211> 5
<212> PTR
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Región de unión

<400> 21

Ser Glu Gly Val Leu
1 5

20 <210> 22
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Región de unión

<400> 22
gaggagcca ttgtagtt aacaacaaca aacaccaaa 39

30 <210> 23
<211> 5
<212> PTR
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Región de unión

40 <400> 23
Glu Gly Ala Ile Trp
1 5

45 <210> 24
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> cebador sintético

<400> 24
taaaaacagc atattgacgc tgggag 26

55 <210> 25
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> cebador sintético

<400> 25
gactagaggt tagaggagac 20

<210> 26

<211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> cebador sintético
 <400> 26
 gactagcggg tagaggagac ccc 23
 10 <210> 27
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> cebador sintético
 <400> 27
 20 tcgggccccg ctgctgcgtt g 21
 <210> 28
 <211> 21
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador sintético
 30 <400> 28
 ttgggccccg ctgctgcgtt g 21
 <210> 29
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador sintético
 40 <400> 29
 tgtgtcatgg gaggggtctc 20
 <210> 30
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> cebador sintético
 50 <400> 30
 gctacaccgt gcgtacagct tcc 23
 55 <210> 31
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> cebador sintético
 <400> 31
 65 gcagcctccc aggttttacg tcc 23

ES 2 585 553 T3

5 <210> 32
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador sintético

10 <400> 32
aacaacaaca aacaccaaag gctattg 27

15 <210> 33
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador sintético

20 <400> 33
cctaccgga ccagaacctg ttg 23

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un ácido nucleico que codifica un virus del dengue atenuado o un virus del dengue quimérico que comprende una mutación $\Delta 30$ que retira la estructura homóloga TL-2 en los serotipos 1, 2, 3, o 4 del virus del dengue, y los nucleótidos adicionales de la mutación $\Delta 30$ delecionados de la UTR-3' que retira al menos 19 nucleótidos en la dirección 5' justo en el límite de la región 5' de la estructura homóloga TL-3 en cada uno de los serotipos 1, 2, 3 y 4 del virus del dengue y en el que los al menos 19 nucleótidos se encuentran entre los nucleótidos 113 y 258.
- 10 2. El ácido nucleico que codifica un virus del dengue o un virus del dengue quimérico de la reivindicación 1 en el que la mutación retira la estructura homóloga TL-2 y retira los nucleótidos adicionales de una manera contigua a la mutación $\Delta 30$.
- 15 3. El ácido nucleico que codifica un virus del dengue o un virus del dengue quimérico de la reivindicación 2, en el que la mutación es la mutación $\Delta 86$, de tal manera que la mutación $\Delta 86$ deleciona nucleótidos de aproximadamente 228 a aproximadamente 145 de DEN1, nucleótidos de aproximadamente 228 a aproximadamente 144 de DEN2, nucleótidos de aproximadamente 228 a aproximadamente 143 de DEN3, y nucleótidos de aproximadamente 228 a aproximadamente 143 de DEN4, designados con el sistema de numeración inversa.
- 20 4. El ácido nucleico que codifica un virus del dengue o un virus del dengue quimérico de la reivindicación 1, en el que la mutación retira tanto la estructura homóloga TL-2 como los nucleótidos adicionales de una manera no contigua en la mutación $\Delta 30$.
- 25 5. El ácido nucleico que codifica un virus del dengue o un virus del dengue quimérico de la reivindicación 4 en el que la mutación es la mutación $\Delta 30/31$, de tal manera que la mutación $\Delta 30$ deleciona nucleótidos de aproximadamente 174 a aproximadamente 145 de DEN1, nucleótidos de aproximadamente 173 a aproximadamente 144 de DEN2, nucleótidos de aproximadamente 173 a aproximadamente 143 de DEN3 y nucleótidos de aproximadamente 172 a aproximadamente 143 de DEN4, designados con el sistema de numeración inverso, y la mutación $\Delta 30$ deleciona los nucleótidos de aproximadamente 258 a aproximadamente 228 de DEN1, los nucleótidos de aproximadamente 258 a aproximadamente 228 de DEN2, los nucleótidos de aproximadamente 258 a aproximadamente 228 de DEN3, y los nucleótidos de aproximadamente 258 a aproximadamente 228 de DEN4, denominados con el sistema de numeración inversa.
- 30 6. Un virus del dengue que comprende el ácido nucleico que codifica el virus del dengue de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
- 35 7. Una composición inmunogénica que comprende un ácido nucleico que codifica un virus del dengue de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o un virus del dengue de la reivindicación 16.
- 40 8. El ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o la composición inmunogénica de la reivindicación 7 para su uso en la inducción de una respuesta inmunitaria en un paciente.
- 45 9. El ácido nucleico que codifica un virus del dengue o un virus del dengue quimérico de la reivindicación 1 en el que el serotipo es DEN1.
10. El ácido nucleico que codifica un virus del dengue o un virus del dengue quimérico de la reivindicación 1 en el que el serotipo es DEN3.

Figura 1A Delección de nucleótidos adicionales de la UTR 3':

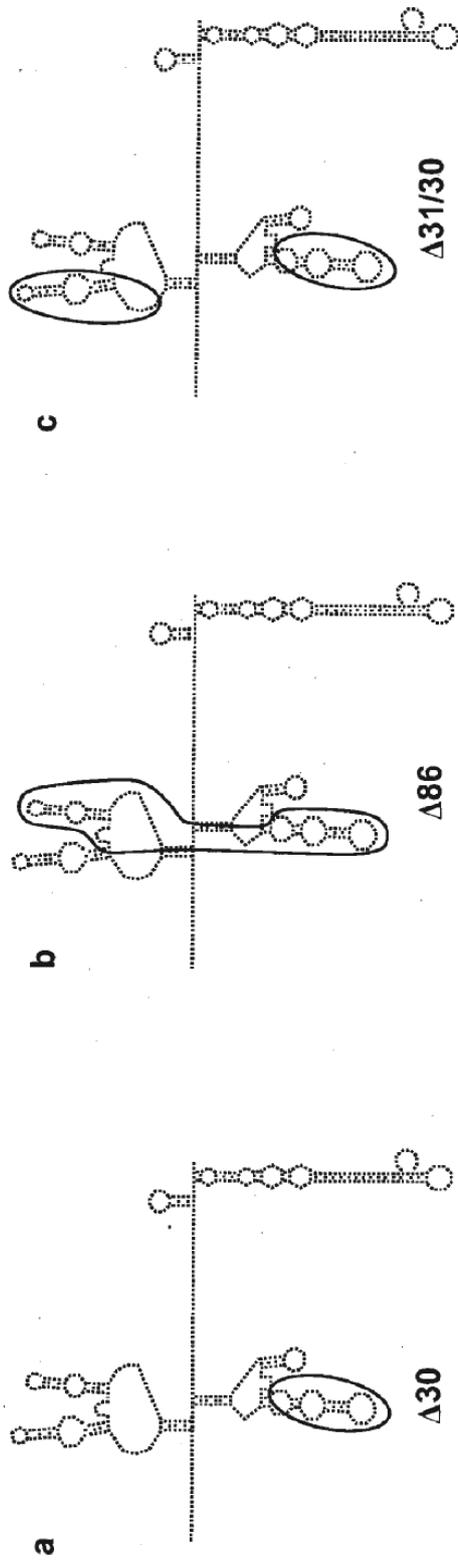
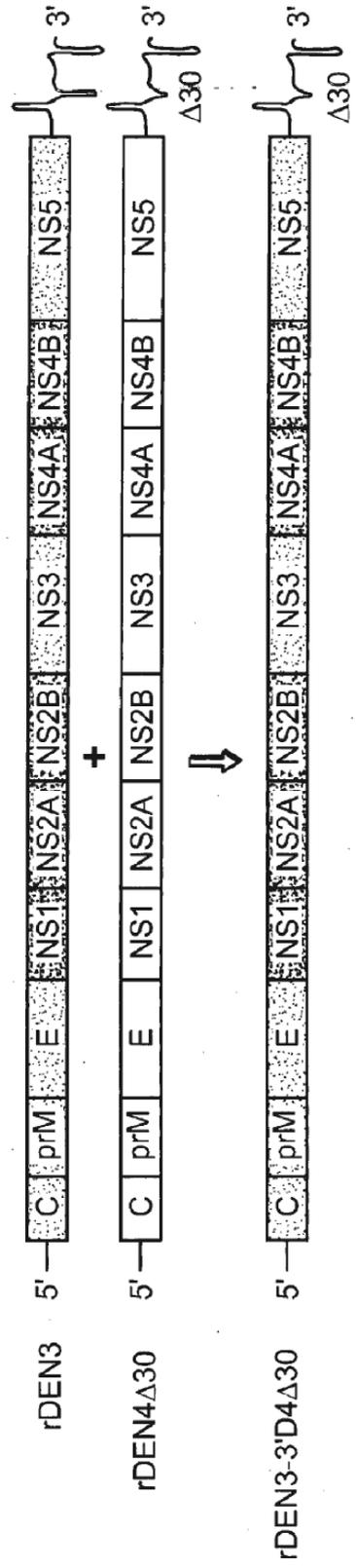


Figura 1B Reemplazo de la UTR 3' de DEN3 con UTR de DEN4 Δ 30:



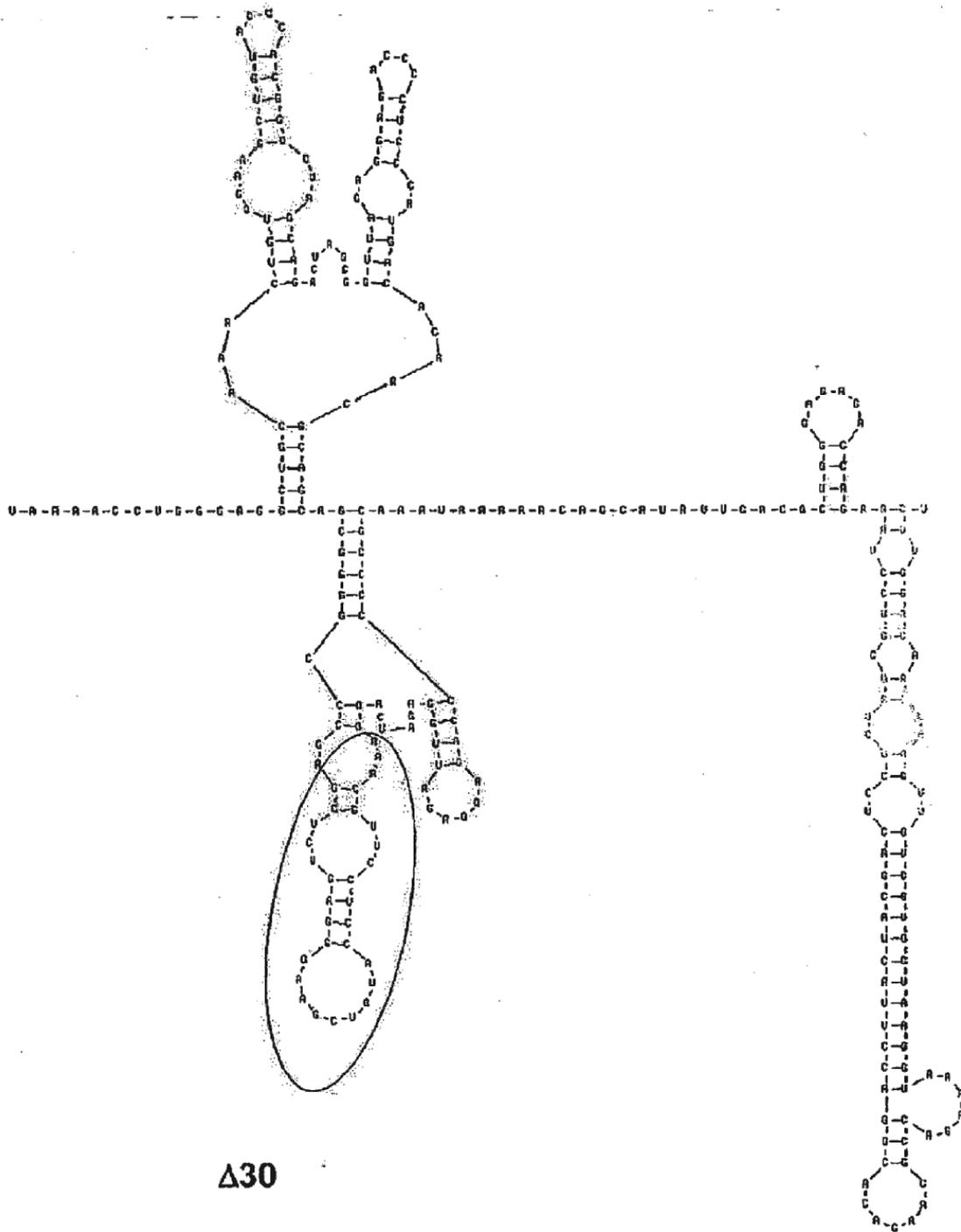


Figura 1a

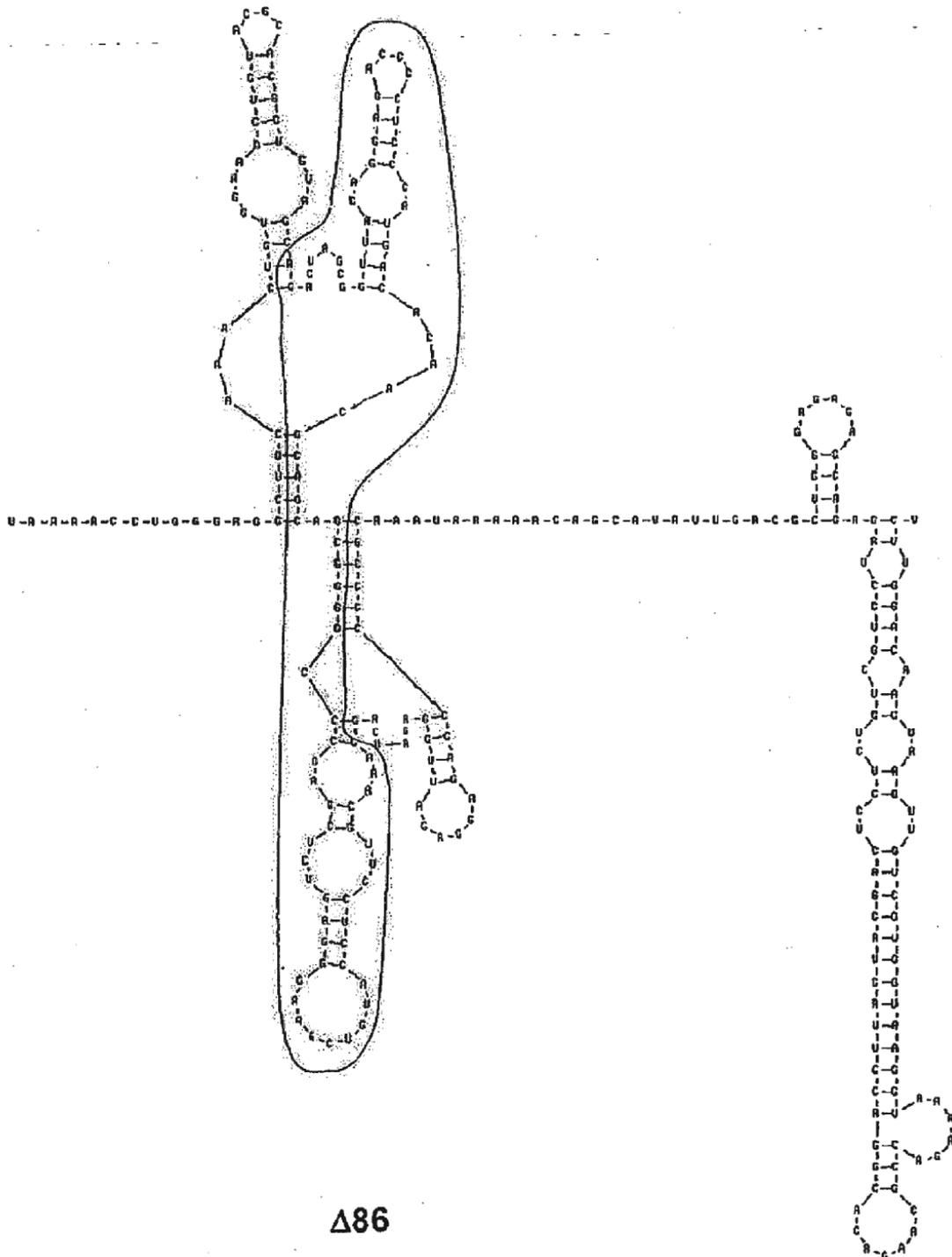


Figura 1b

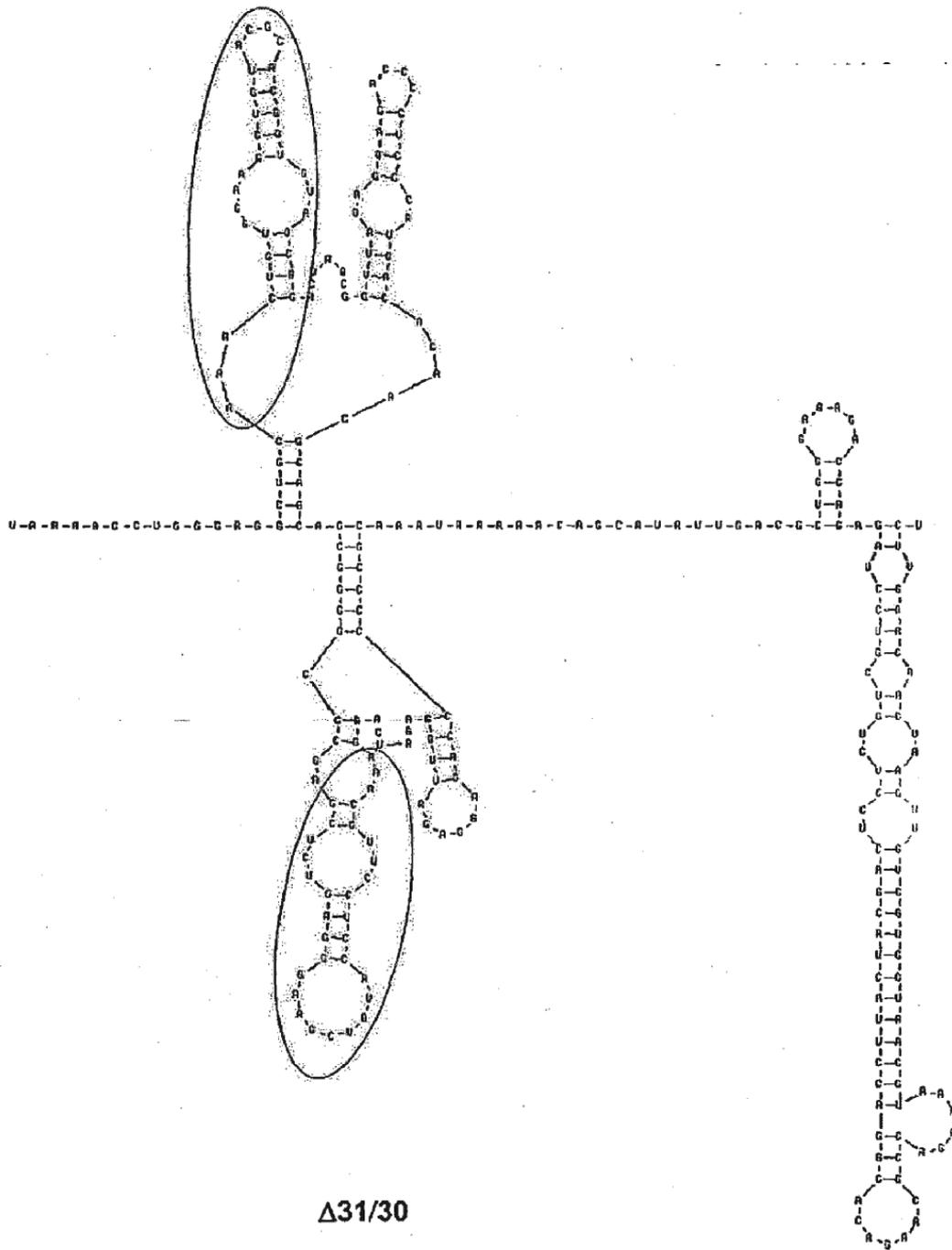


Figura 1c

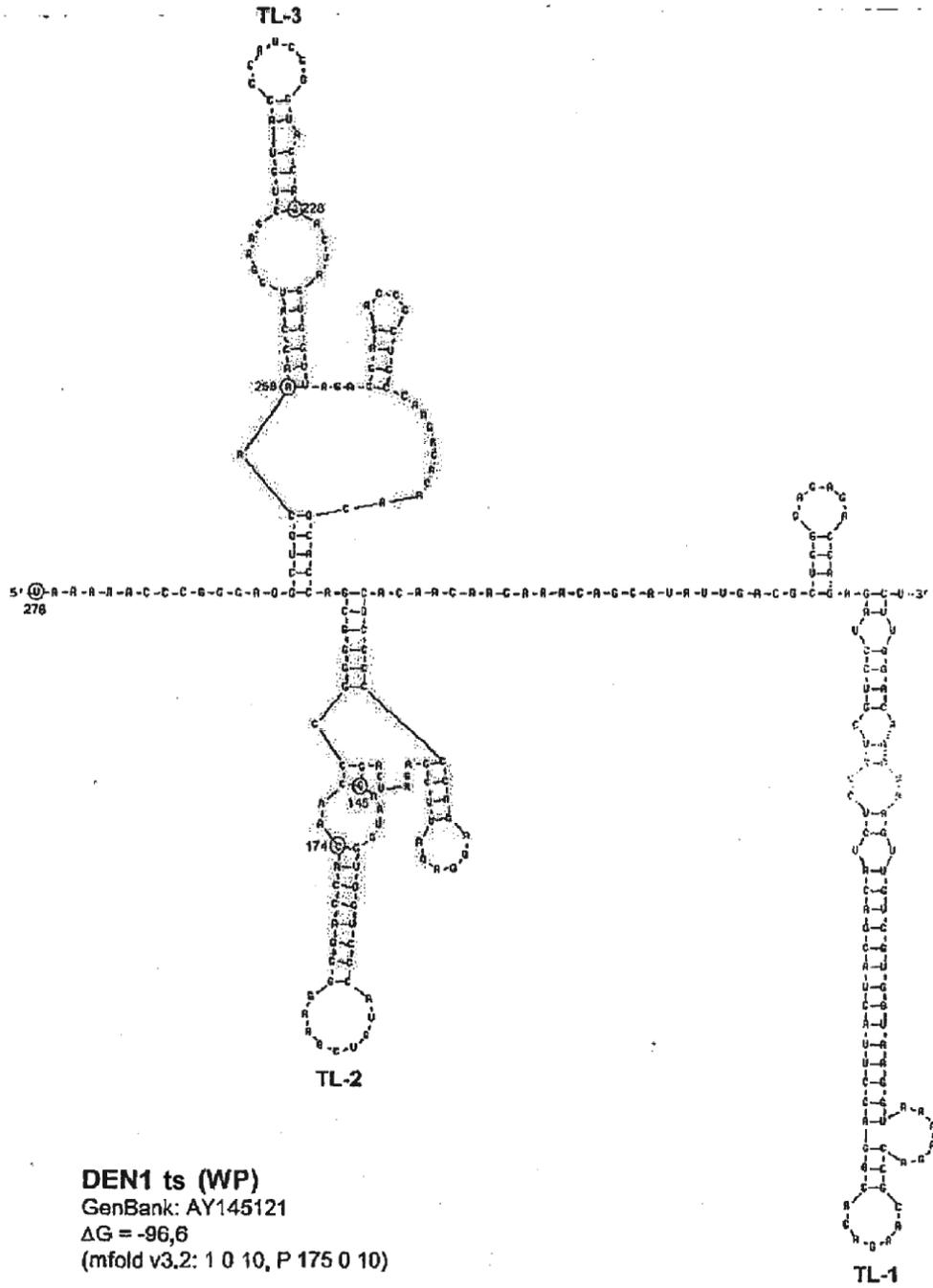
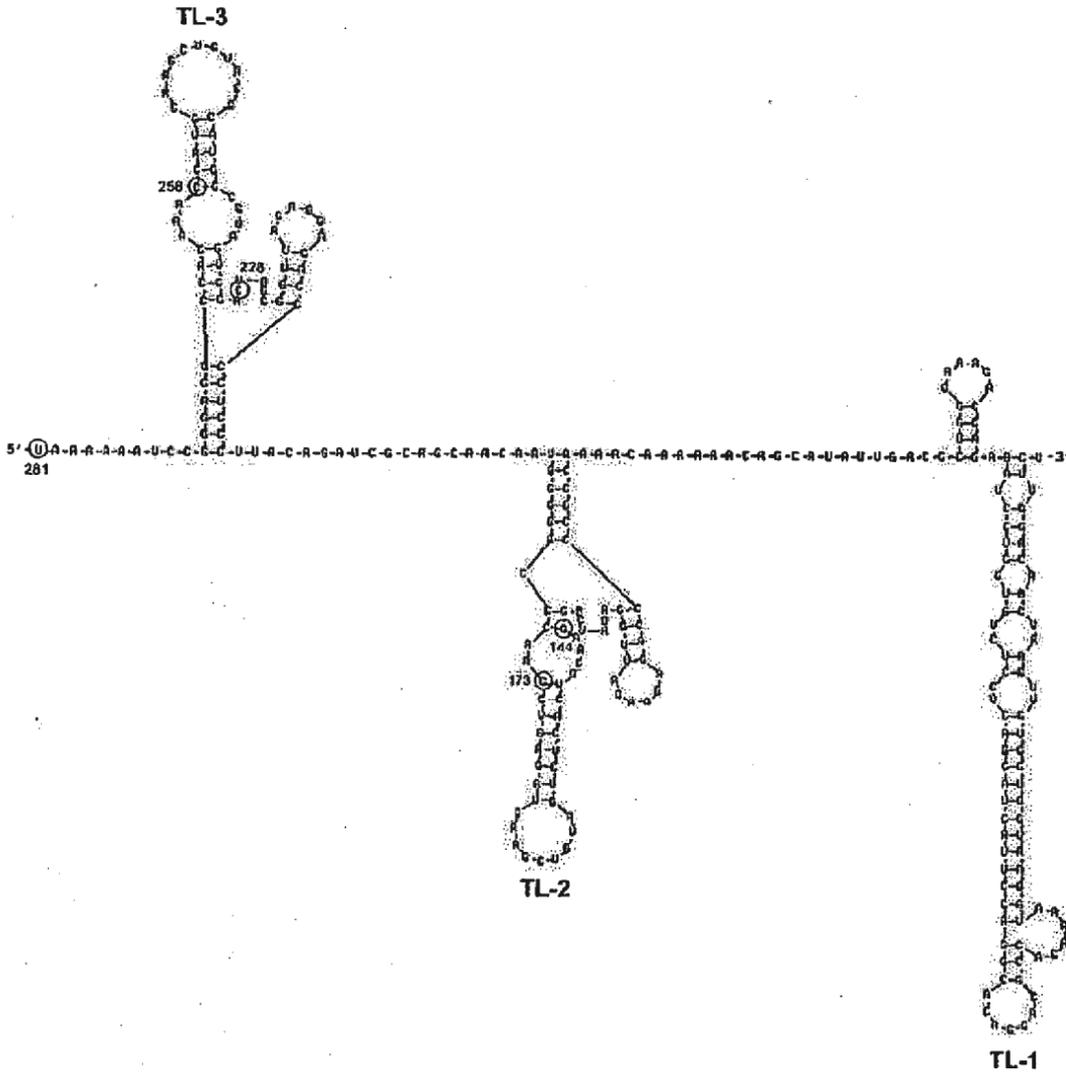


Figura 2



DEN2 ts (Tonga/74)
GenBank: AY744147
 $\Delta G = -88.3$
(mfold v3.2: 1 0 10, P 79 0 14, P 178 0 10)

Figura 3

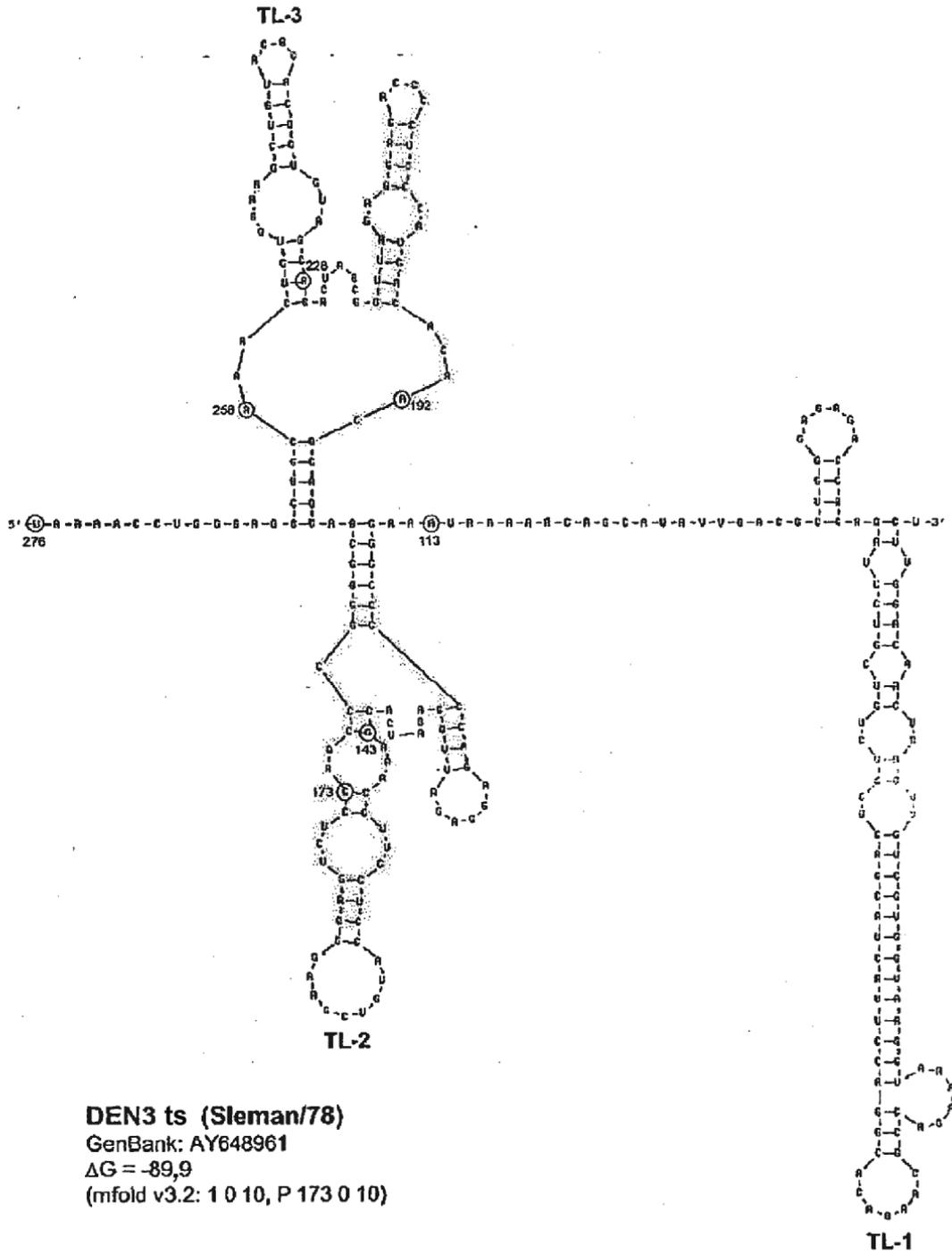
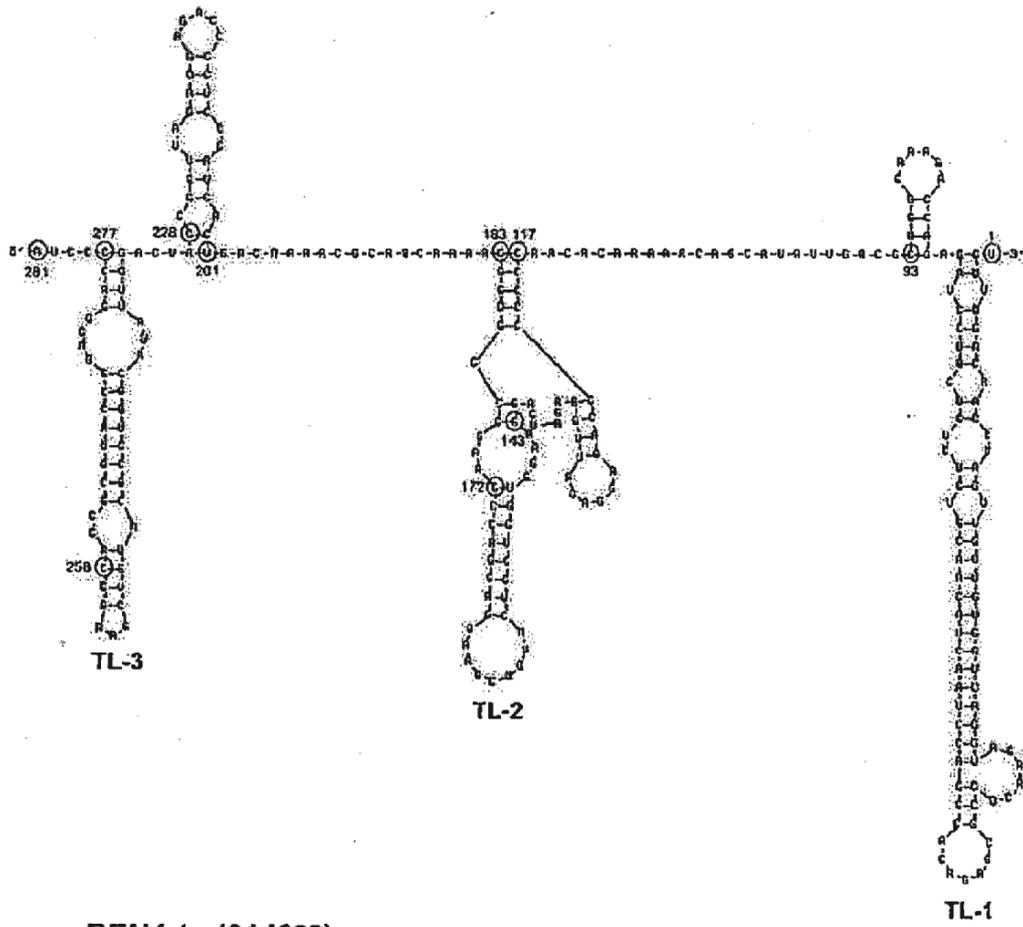


Figura 4



DEN4 ts (814669)
GenBank: AF326573
 $\Delta G = -98,8$
(mfold v3.2: 1 0 4, P 82 0 15, P 168 0 20)

Figura 5

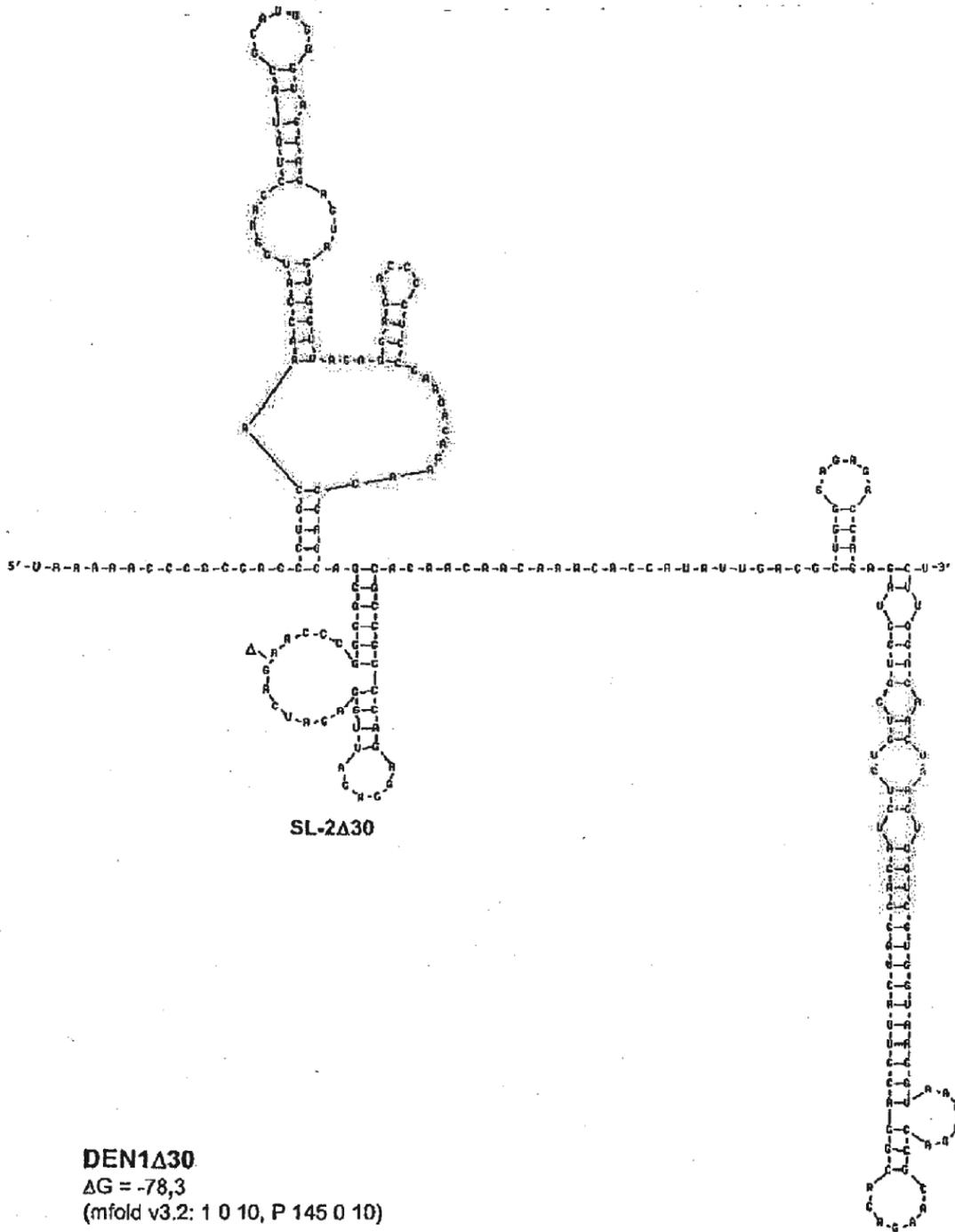
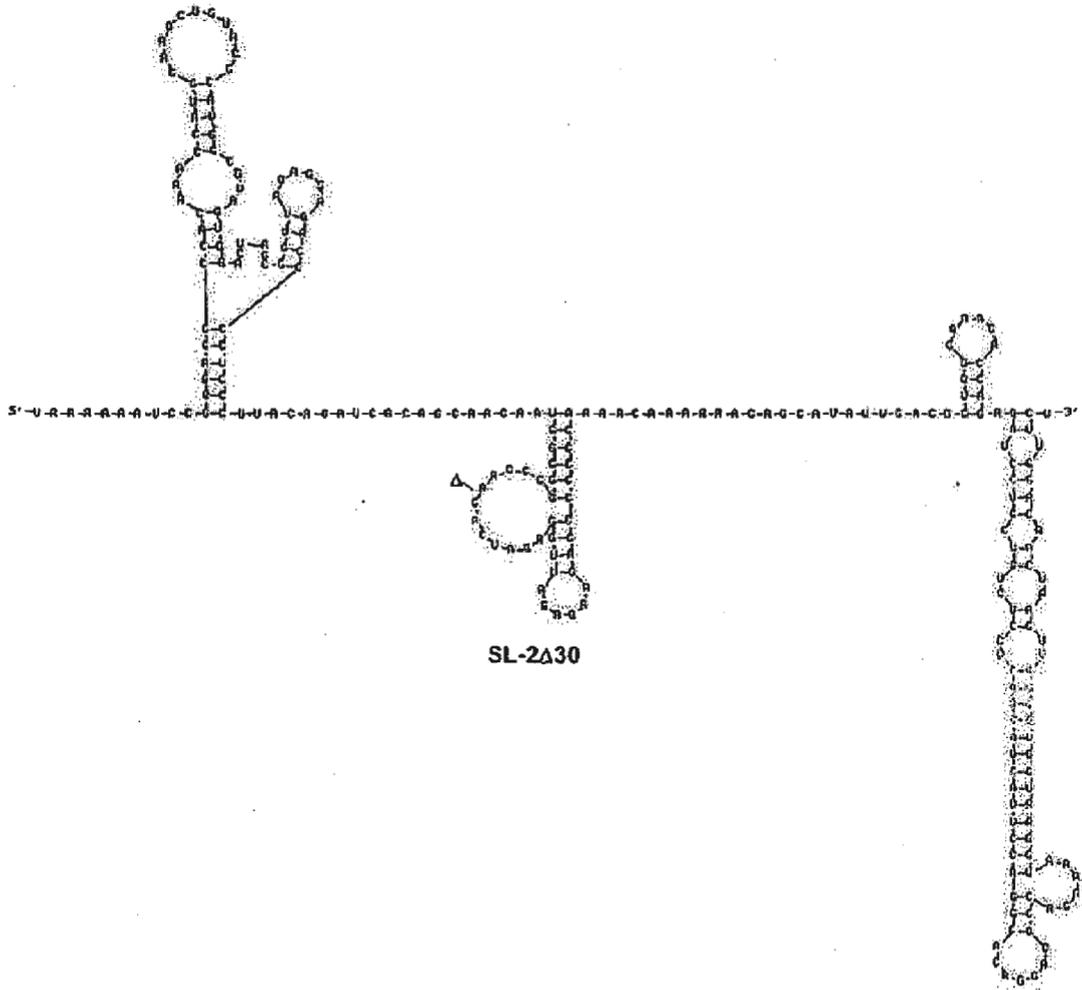


Figura 6



DEN2 Δ 30
 $\Delta G = -76,0$
(mfold v3.2: 1 0 10, P 79 0 14, P 148 0 10)

Figura 7

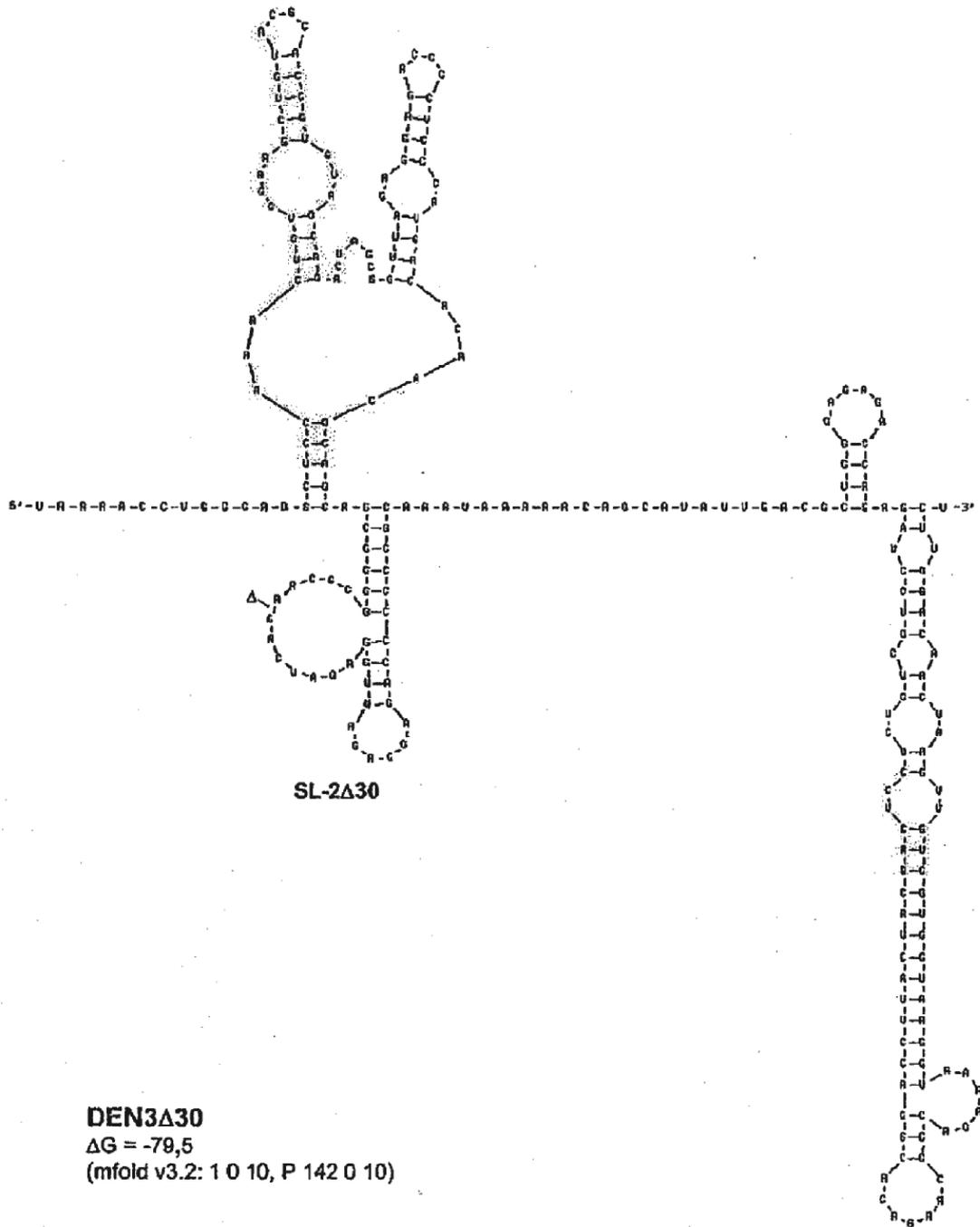


Figura 8

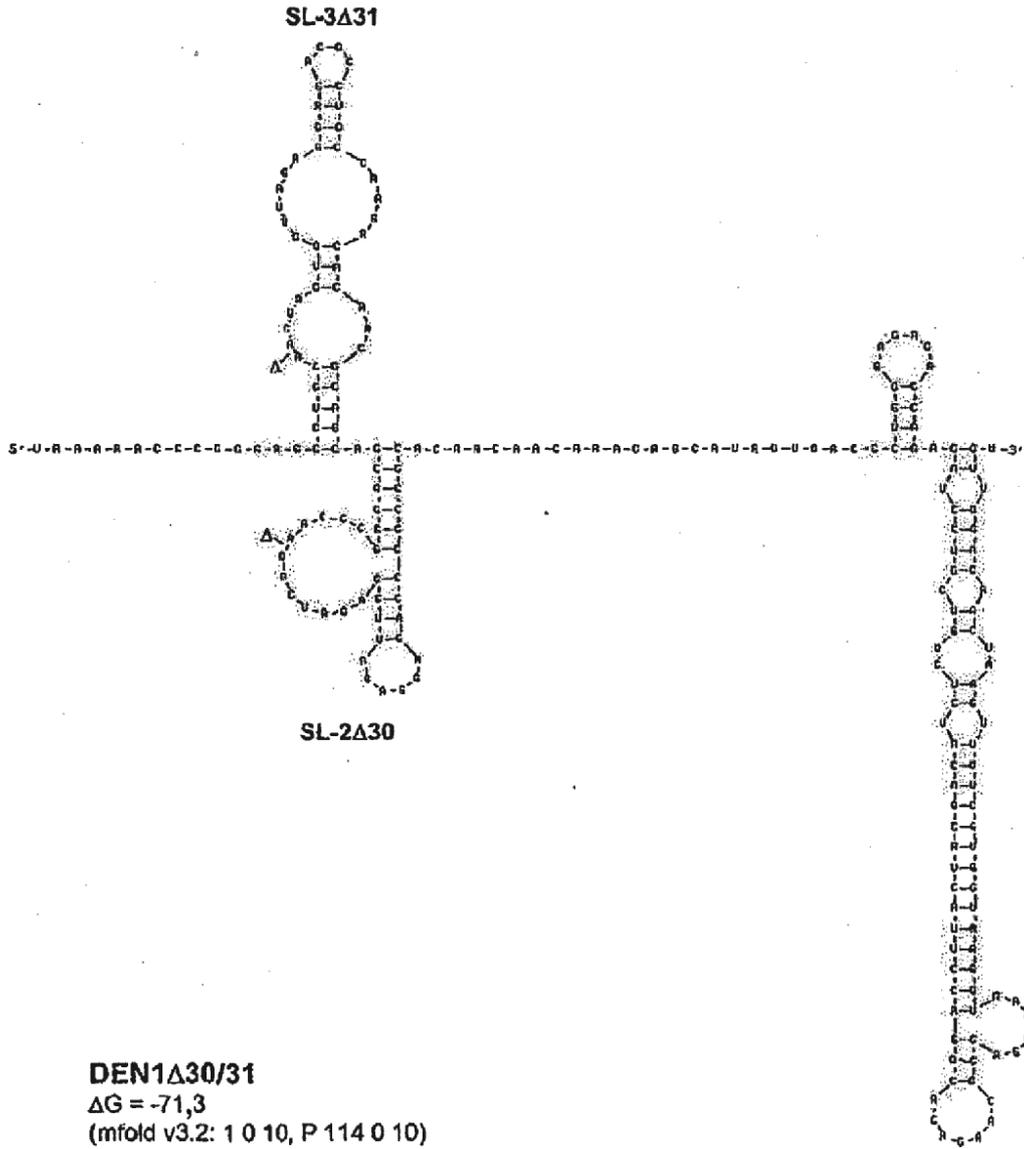
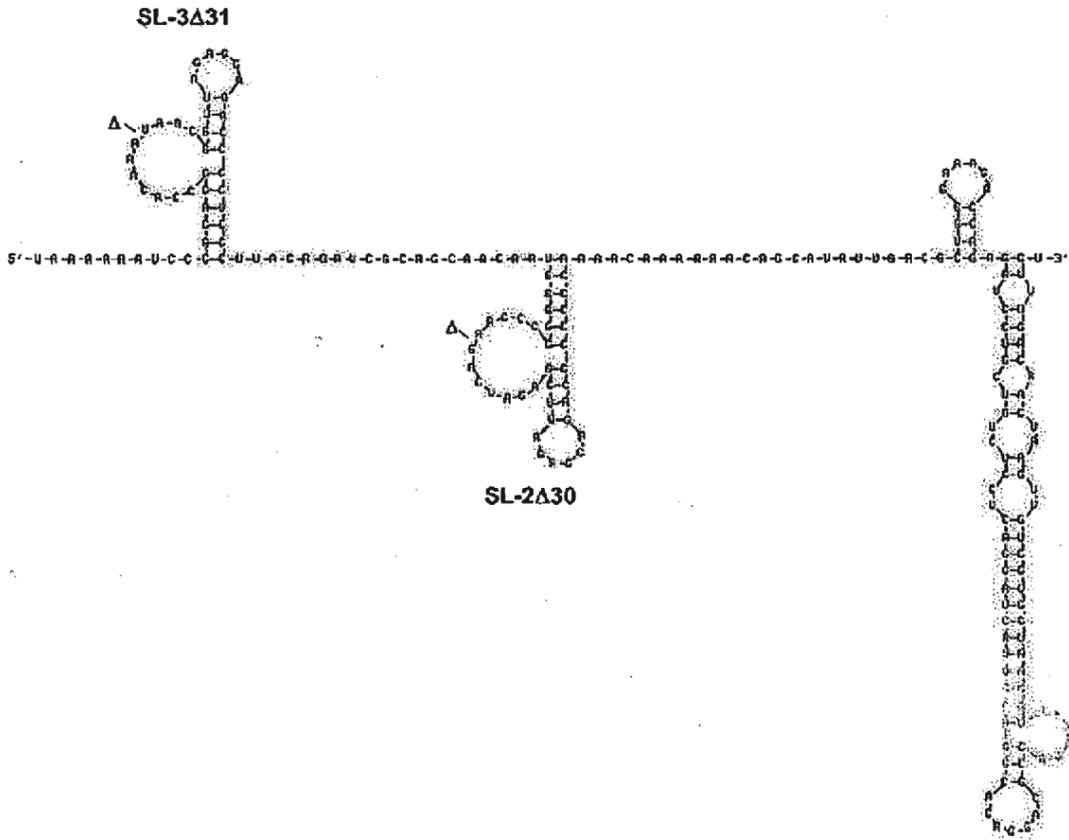


Figura 10



DEN2Δ30/31
 $\Delta G \approx -65,7$
(mfold v3.2: 1 0 10, P 48 0 14, P 117 0 10)

Figura 11

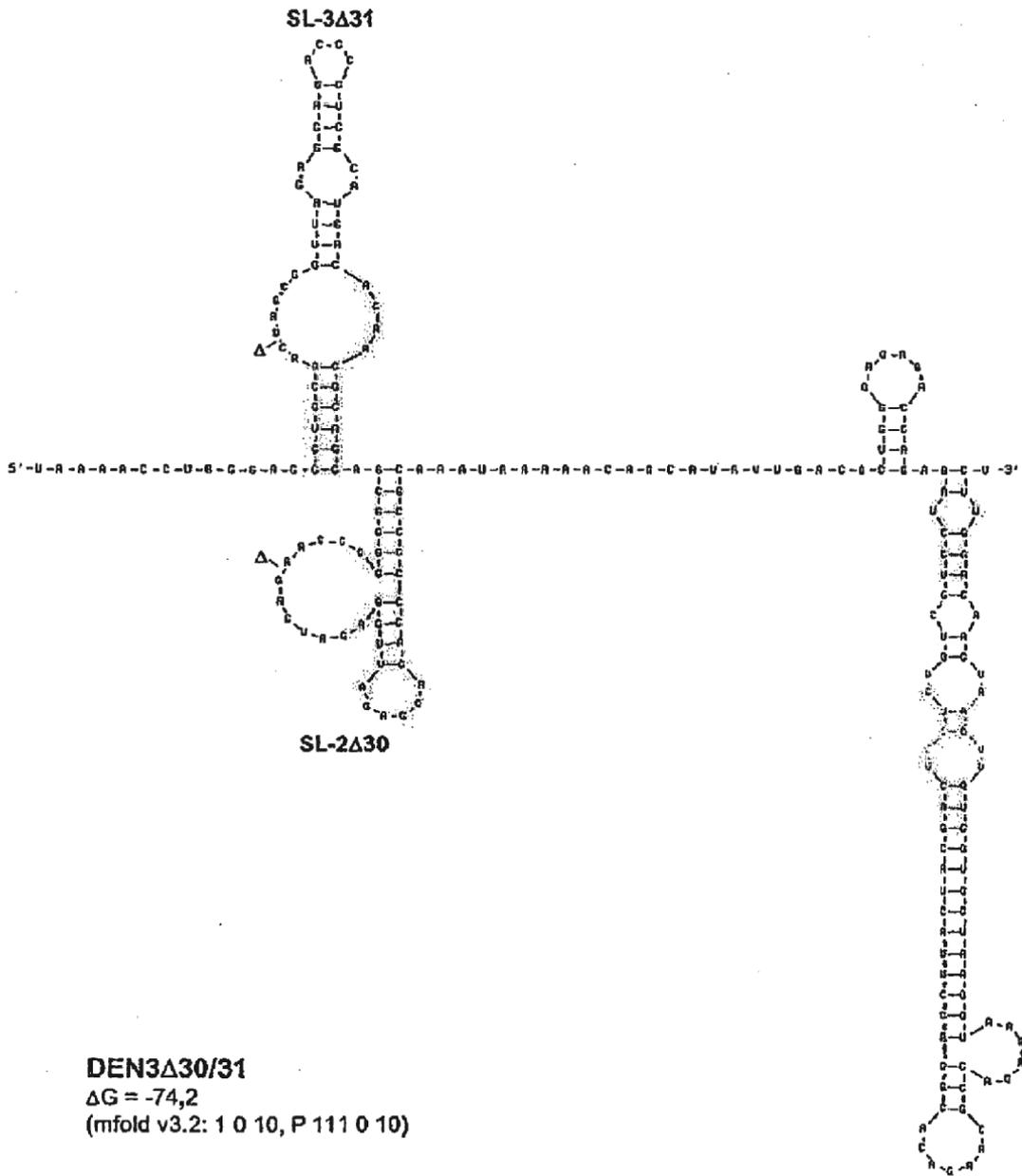


Figura 12

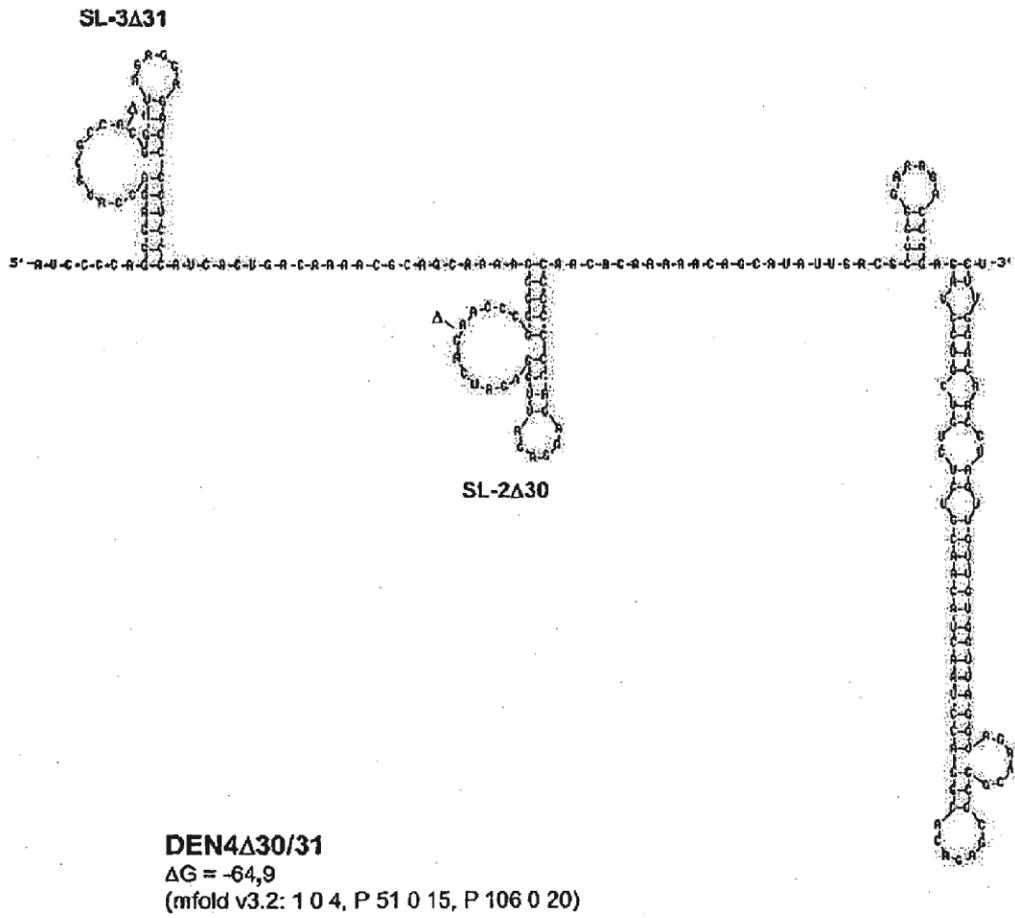


Figura 13

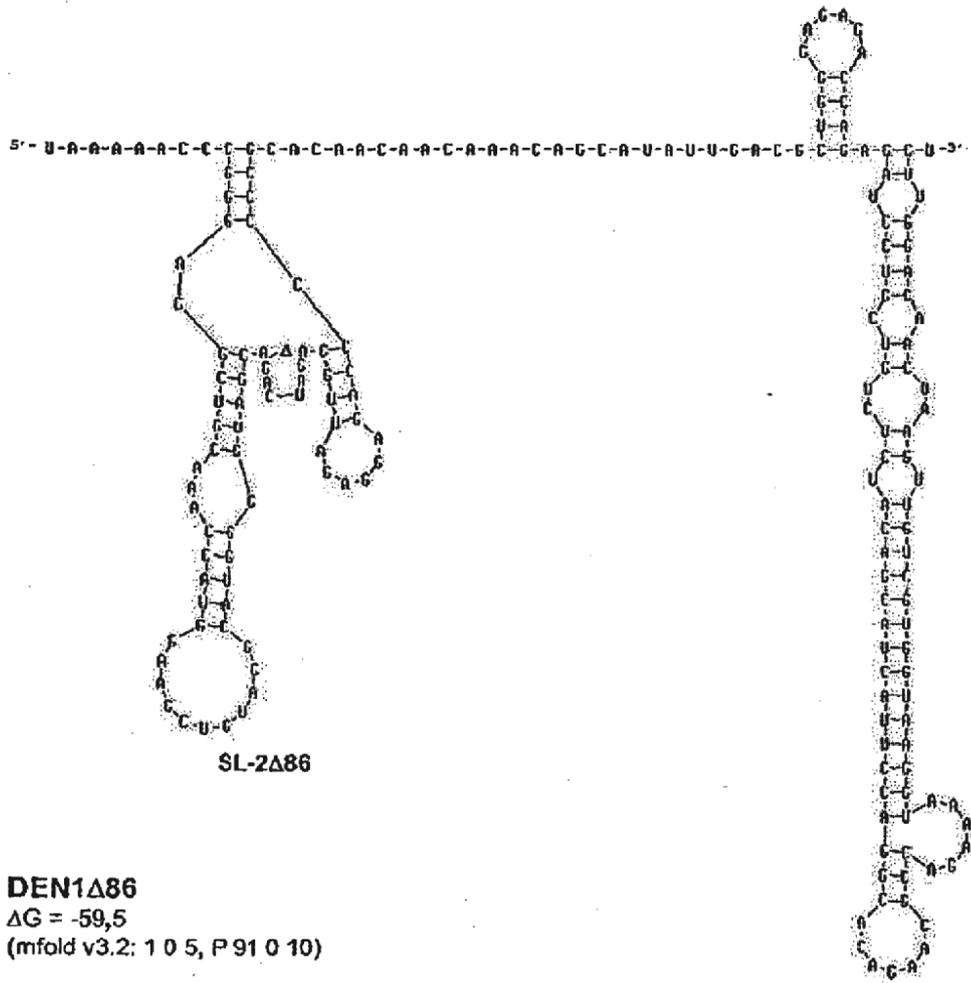
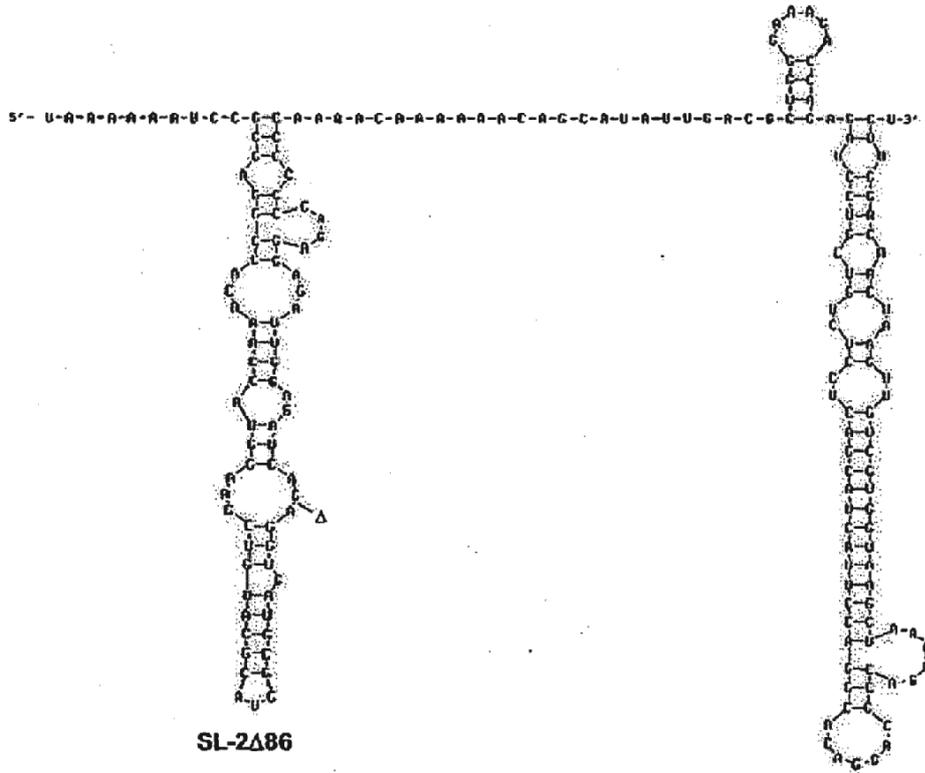


Figura 14



DEN2Δ86
 $\Delta G = -58,6$
(mfold v3.2: 1 0 10, P 93 0 10)

Figura 15

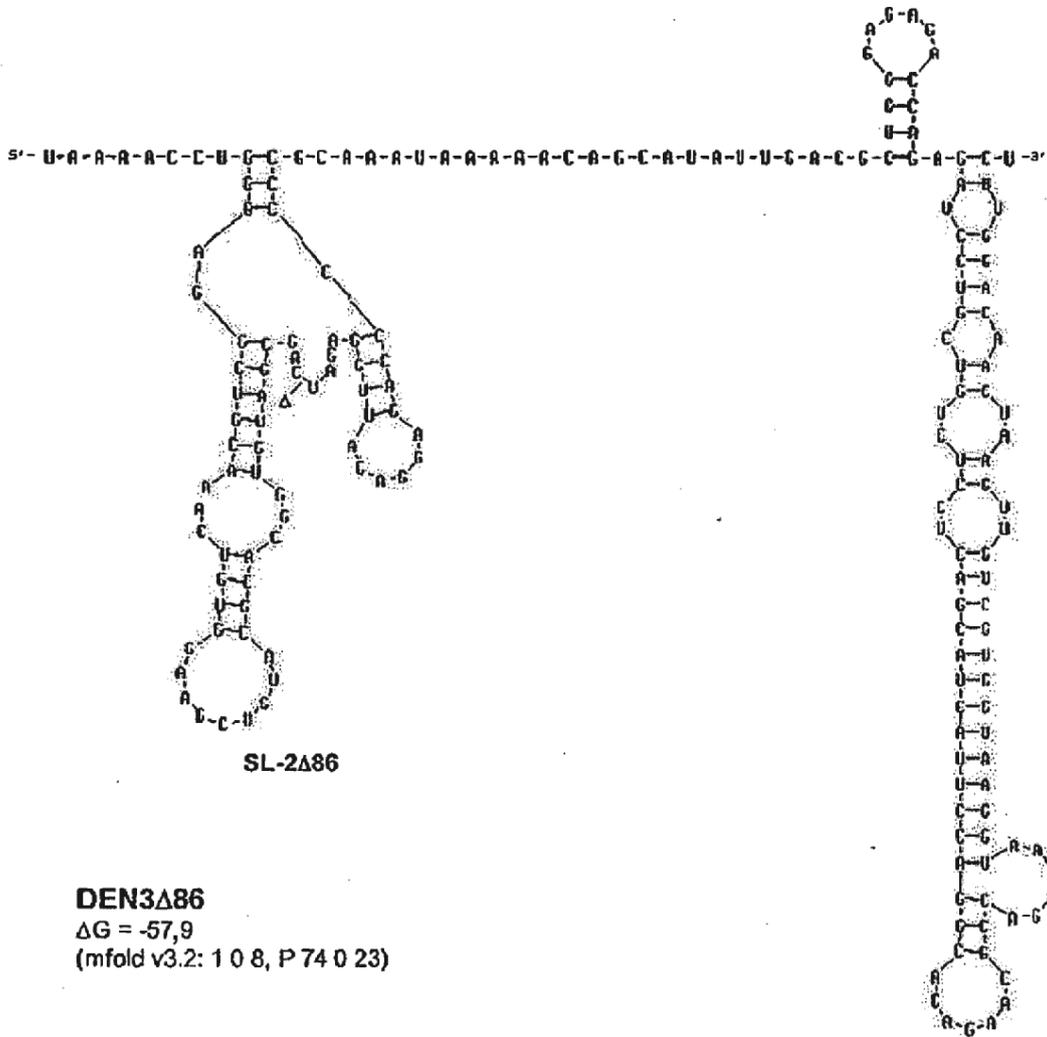
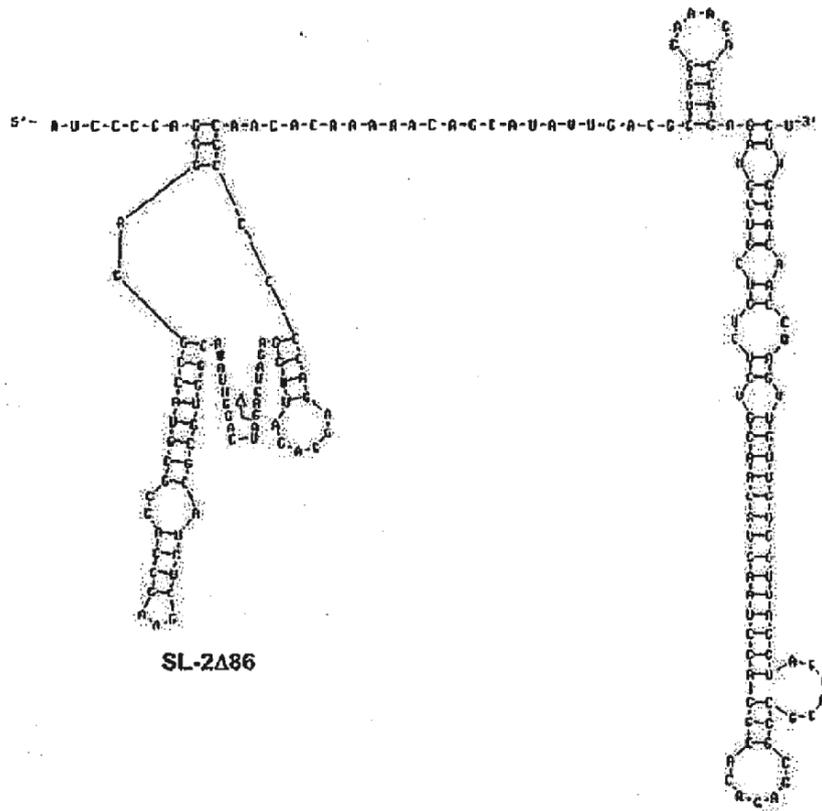


Figura 16



DEN4Δ86
 $\Delta G = -61,8$
(mfold v3.2: 1 0 4, P 82 0 20)

Figura 17

Figura 18A

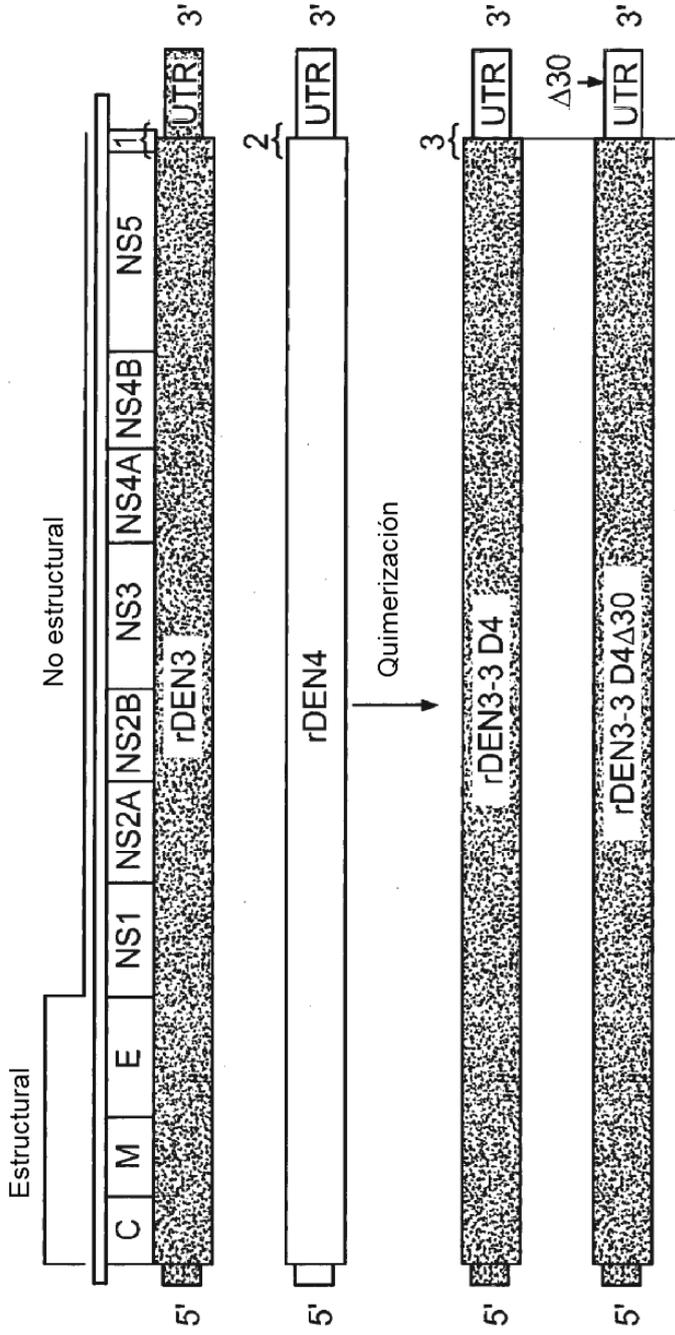
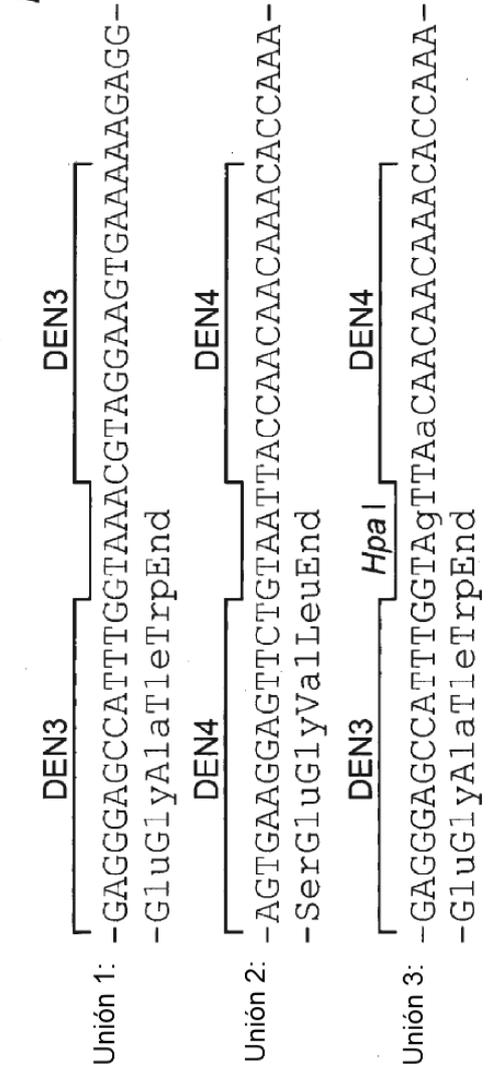


Figura 18B



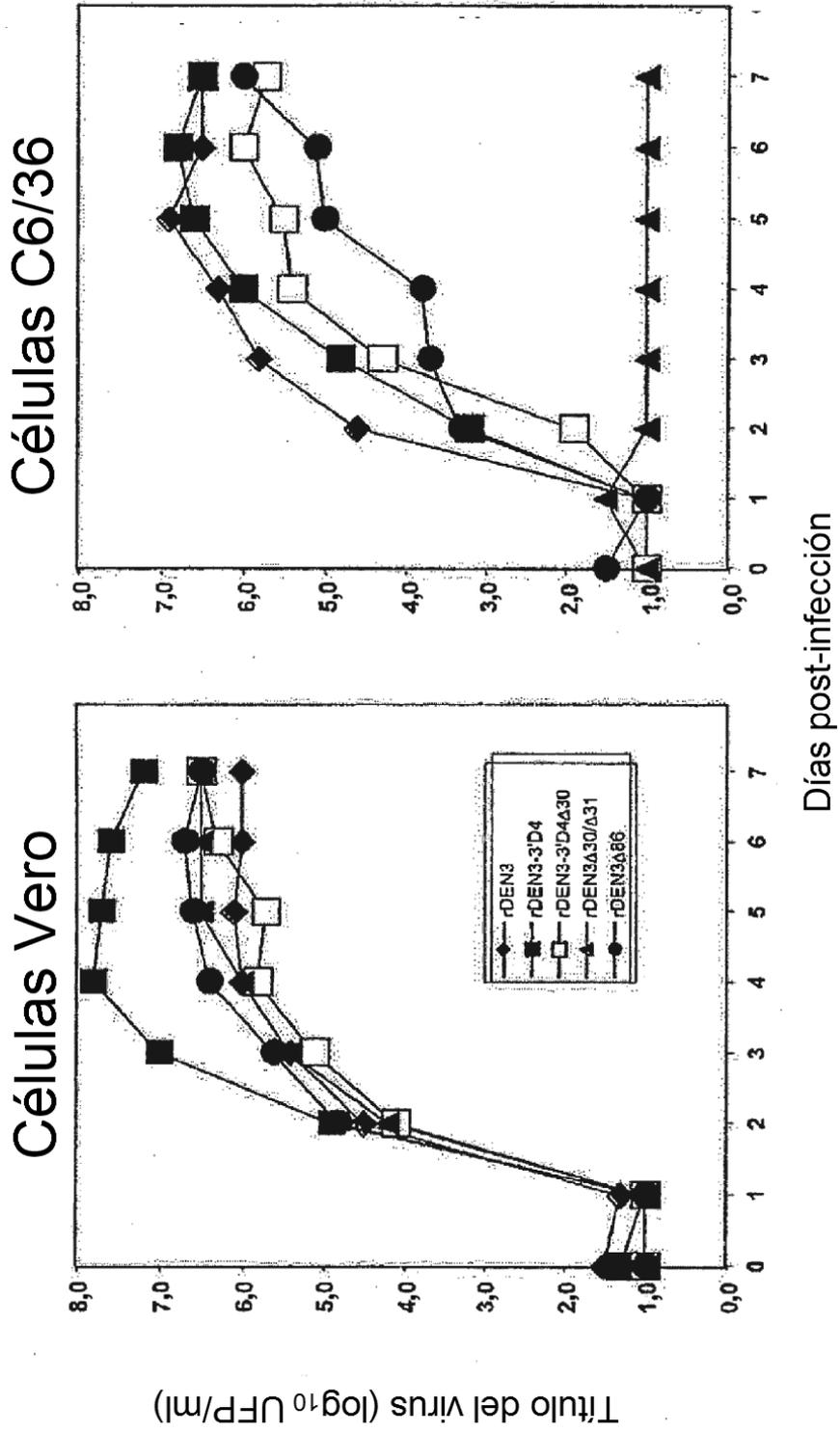


Figura 19