

PROCESO DE PREPARACIÓN DE UNA VACUNA TETRAVALENTE ATENUADA CONTRA EL VIRUS DEL DENGUE

Incorporación del listado de secuencias

[1] El listado de secuencias contenido en el archivo cuyo nombre es "60135__146578_ST25.txt", de 56.450 bytes (medido con el sistema operativo MS-Windows), creado el 31 de agosto, 2015, se presenta aquí como una entrega electrónica y se incorpora por completo en la presente a modo de referencia.

Campo de la invención

[2] La presente invención se encuentra en el campo de la biotecnología. La presente invención se refiere a un proceso para preparar una vacuna tetravalente atenuada contra el virus del dengue. La presente invención también se refiere a una vacuna tetravalente atenuada contra el dengue. La presente invención también se refiere al uso de una composición para reconstituir la vacuna. La presente invención también se refiere a un método para inducir una respuesta inmunológica a los serotipos 1, 2, 3 y 4 en un paciente. La presente invención también se refiere a un conjunto de elementos de una vacuna tetravalente contra el dengue.

Antecedentes

[3] Actualmente, el dengue es una enfermedad de gran impacto sobre la salud pública en Brasil. Afecta a la mitad de la población de todo el mundo que vive en regiones endémicas, principalmente en el Sudeste Asiático (región del Pacífico) y América. De acuerdo con la OMS, en un estudio reciente se estimó que hay aproximadamente 390 millones de infecciones por dengue por año (284-528 millones con un intervalo de confianza del 95%), de los cuales 96 millones (67-136 millones) presentan manifestaciones clínicas (con distintos rangos de severidad de la enfermedad) [1]. En otro estudio acerca de la prevalencia del dengue, se estimó que 3900 millones de personas, de 128 países, están en riesgo de contraer una infección por el virus de dengue [2].

[4] En Brasil, en el año 2000 la incidencia era de 200.000 casos de dengue y en el 2010 había más de un millón de casos. En el 2015, en Brasil había 460.502 casos informados de dengue hasta el mes de marzo. La región sudeste presentaba el mayor número de casos informados (304.251 casos, 66,1%) en

comparación con el resto del país, seguido por el medio oeste (59.855 casos; 13%), el noreste (51.221 casos; 11,1%), el norte (19.402 casos; 4,2%) y el sur (25.773 casos, 5.6% [3].

[5] La fiebre del Dengue (DF) y su forma severa, la fiebre hemorrágica del dengue (DHF)/síndrome de shock por dengue (DSS), es causada por una infección por cualquiera de los serotipos del dengue DEN1, DEN2, DEN3 y DEN4.

[6] Dado que actualmente no hay un fármaco antiviral para tratar esta enfermedad y que las estrategias para controlar el mosquito vector (*Aedes aegypti*) han demostrado ser ineficaces, la única manera para controlar el avance del dengue es por medio de la prevención, con el uso de una vacuna contra los cuatro tipos del virus del dengue. En este momento, no hay vacunas contra el dengue certificadas para uso en humanos. Los estudios epidemiológicos indican que una infección primaria con uno de los serotipos del dengue habitualmente causa DF, y la probabilidad que una segunda infección cause DHF es 15-80 veces mayor que la probabilidad de la infección primaria. Por lo tanto, una vacuna eficaz contra el dengue debe comprender los cuatro serotipos del virus del dengue [4]. Sin embargo, el desarrollo de una vacuna tetravalente contra el dengue es muy difícil porque este producto debe proporcionar una protección a largo plazo contra todos los serotipos del virus del dengue [5].

[7] La Solicitud de Patente de los EE.UU. N°: 13/305.639, continuación de la Solicitud N°: 12/398.043, presentada el 4 de marzo, 2009, ahora Patente N°: 8.075.903, que es una continuación de la Solicitud N°: 10/970.640, presentada el 21 de octubre, 2004, ahora Patente de los EE.UU. N°: 7.517.531, continuación de la Solicitud N°: PCT/US03/13279, presentada el 25 de abril, 2003, del gobierno de los EE.UU., representado por la Secretaría, Departamento Salud y Servicios Humanos, lleva por título "*Dengue tetravalent vaccine containing a common 30 nucleotide deletion in the 3'-UTR of dengue types 1, 2, 3 and 4, or antigenic chimeric dengue viruses 1, 2, 3 and 4*". La patente anterior se refiere a un producto obtenido a partir de un proceso, que incluye una mezcla de cuatro serotipos del virus del dengue con una supresión de 30 nucleótidos o con un virus antigénico quimérico del dengue.

[8] En la Solicitud de Patente de los EE.UU. N°: 11/982.488, presentada

el 2 de noviembre, 2007, publicada el 31 de mayo, 2012 y concedida el 14 de agosto, 2012, de Monika Simmons *et al*, con el título "*Induction of an immune response against dengue virus using the prime-boost approach*", se describen métodos para la inducción de una respuesta inmunológica contra el virus del dengue. El método para inducir una respuesta inmunológica contra el virus del dengue comprende administrar un inmunógeno no replicante seguido por un refuerzo con una vacuna viral tetravalente viva atenuada. Otro aspecto es un método para inducir una respuesta inmunológica contra el virus del dengue que emplea un régimen de sensibilización-refuerzo heterólogo, donde el inmunógeno sensibilizante comprende un sistema de expresión de ADN, un vector de expresión de adenovirus o un sistema de replicón viral de la encefalitis equina venezolana y el inmunógeno de refuerzo comprende lo mismo pero sin el sistema de expresión de ADN. Cada sistema de expresión contiene secuencias de ADN que codifican proteínas virales del dengue. En la patente anterior se describe un esquema inmunológico para una vacuna contra el dengue. En este esquema se usa la primera inmunización como un inmunógeno no replicante y después una vacuna tetravalente viva atenuada contra el dengue. El objeto de la presente solicitud patente es un proceso para obtener una vacuna viva atenuada contra el dengue.

[9] La presente invención describe el desarrollo de una vacuna contra los cuatro tipos de virus del dengue usando las cepas atenuadas del virus rDEN1Δ30-1545 (SEQ ID N°: 1) y variantes de la misma; rDEN2/4Δ30(ME)-1495,7163 (SEQ ID N°: 2) y variantes de la misma; rDEN3Δ30/31-7164 (SEQ ID N°: 3) y variantes de la misma; y rDEN4Δ30-7132,7163,8308 (SEQ ID N°: 4) y variantes de la misma. Algunos de los virus del dengue rDEN1Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3Δ30 y rDEN4Δ30 recombinantes atenuadas se describen en las Patentes de los EE.UU. N°: 7.517.531, N°: 7.226.602 y N°: 8.337.860, que se incorporan por completo en la presente a modo de referencia.

[10] La vacuna de la presente invención, denominada vacuna contra el dengue 1, 2, 3, 4 (atenuada), se presenta en una forma liofilizada en viales con 10 dosis. En el desarrollo de esta vacuna se estableció el siguiente proceso: producción de células Vero y los serotipos 1, 2, 3 y 4 virus del dengue para

obtener los bancos de células y virus; producción de suspensiones virales con células y virus de estos bancos; concentración de estas suspensiones y preparaciones a granel; formulación de vacunas monovalentes y tetravalentes; llenado; liofilización y sellado del producto.

[11] Como se puede apreciar, ninguno de los documentos del arte anterior divulga o sugiere un proceso para preparar una vacuna tetravalente atenuada contra el dengue que permita una producción a gran escala de una vacuna contra el dengue.

BREVE SÍNTESIS DE LA INVENCION

[12] Para poder resolver los problemas mencionados precedentemente, la presente divulgación ofrecerá ventajas significativas frente a los procesos existentes para preparar vacunas tetravalentes contra el dengue. Inicialmente, en determinadas formas de realización de la presente invención se utilizan cepas de células Vero de pasaje bajo (pasaje 123), que permite un elevado número de subcultivos de esta línea celular, es decir, un gran rendimiento. Además, se prepararon bancos de células Vero maestro y de trabajo con células mantenidas en medio de cultivo libre de suero, se subcultivaron con una tripsina no animal y se estabilizaron con 5% de DMSO. El uso de un medio libre de suero conduce a una mayor reproducibilidad, sin mencionar que el uso de una tripsina no animal en los subcultivos de mantenimiento y amplificación de células Vero vuelve al proceso más seguro y libre de la posibilidad de contaminación del producto final con un circovirus porcino. Aún más, las células Vero se pueden cultivar en frascos TC (frascos de cultivo tisular) de 225 cm² o Nunc™ Cell Factory System™, con 10 capas de bandejas (Thermo Fisher Scientific Inc. Pittsburgh, PA, EE.UU.; un área de cultivo de aproximadamente 6.320 cm²), que permite una gran producción de células/frasco TC de hasta aproximadamente 2×10^9 células/CFS. La replicación adicional del virus del dengue en células Vero, a partir de las cuales se prepararon los bancos de siembra del virus de trabajo, aumentó la productividad del proceso. El volumen final de la suspensión viral obtenida en un ciclo de producción con CFS es de 14 l (un volumen elevado). En determinadas formas de realización de la presente invención, se pueden obtener hasta siete cosechas aproximadamente en un solo ciclo de producción del virus. Las suspensiones del virus del dengue se

cosechan de células infectadas separando el medio que contiene al virus del cultivo, reemplazando el medio retirado por medio fresco, incubando las células infectadas con el medio nuevo y cosechando el medio que contiene virus después de la incubación, lo cual también aumenta la productividad de los procesos provistos en la presente. La presente divulgación también describe el tiempo óptimo para cosechar los sobrenadantes de las suspensiones virales por medio de estudios de las curvas de replicación de los serotipos 1, 2, 3 y 4 del virus del dengue en células Vero cultivadas en frascos TC y el Cell Factory System™, lo que permite aumentar el número de cosechas. En determinadas formas de realización, la vacuna tetravalente de la presente divulgación se prepara con vacunas monovalentes que contienen diferentes títulos del virus dengue de acuerdo con cada serotipo ($5,7 \pm 0,2$, $5,6 \pm 0,2$, $6,1 \pm 0,2$ y $5,8 \pm 0,2$ Log₁₀ PFU/ml para DENV1, DENV2, DENV3 y DENV4, respectivamente) lo que permite una mayor homogeneidad de las partículas virales de cada serotipo en la vacuna tetravalente. Finalmente, los pasos de llenado y liofilización del proceso reivindicado proveen una vacuna que es estable por 1 año a 2-8 °C.

[13] En resumen, el proceso para preparar una vacuna tetravalente atenuada contra el dengue de la presente solicitud ofrece un gran rendimiento y es muy reproducible. La vacuna, el producto de dicho proceso, es muy estable y no tiene contaminantes de origen animal (suero y tripsina), usados generalmente en la elaboración de vacunas. Dichas características permiten producir una vacuna contra el dengue a gran escala. Además, la vacuna contra el dengue de la presente divulgación se estuvo evaluando en humanos en Brasil desde noviembre de 2013 (estudios clínicos de fase II). Los datos preliminares de este estudio demostraron que este producto es seguro e inmunogénico.

[14] En un aspecto, la presente invención se refiere a un proceso para preparar una vacuna tetravalente atenuada contra el dengue caracterizado por el hecho que comprende cualquier subconjunto o todos los siguientes pasos de: adaptar células Vero al crecimiento en un medio libre de suero y usar una tripsina que no es de origen animal para obtener subcultivos de las células; amplificar las células Vero en frascos TC de 225 cm² y posteriormente en Cell Factory System™ (CFS); producir el banco de células maestro (MCB) de células Vero, así como el

banco de células de trabajo (WCB) y el banco de siembra y el banco de semillas de siembra con los serotipos 1, 2, 3 y 4 del virus del dengue; infectar las células Vero en frascos TC de 225 cm² o CFS a partir del banco de células de trabajo con los serotipos 1, 2, 3 y 4 del virus del dengue de los bancos de siembra de trabajo del virus; incubar los frascos TC o Cell Factory System™ que contienen las células Vero/suspensión del virus del dengue a 36,5 °C (± 1 °C) por entre 10 y 20 días; cosechar los sobrenadantes, filtrar (membrana de 0,2 μ m de porosidad) y guardar a -80 °C (± 5 °C); preparar preparaciones a granel de los serotipos 1, 2, 3 y 4 del virus del dengue; formular las vacunas monovalentes con estas preparaciones a granel; formular la vacuna tetravalente con cuatro vacunas monovalentes; llenar; liofilizar; sellar; rotular y guardar el producto a 2-8 °C.

[15] En determinadas formas de realización la línea de células Vero usada es ATCC CCL-81.4 (cGMPVero, células de riñón de mono verde africano [*Kidney African Green Monkey*] - *Cercopithecus aeothrops*). En una forma de realización adicional las cepas del virus del dengue utilizadas son rDEN1 Δ 30-1545; rDEN2/4 Δ 30(ME)-1495,7163; rDEN3 Δ 30/31-7164 y rDEN4 Δ 30-7132,7163,8308 del *United States National Institutes of Health* (NIH). En una forma de realización adicional, la MOI de las cepas del virus del dengue para cada serotipo del dengue puede ser de aproximadamente: entre 0,01 y 0,03 para DENV 1 y 4, entre 0,02 y 0,04 para DENV 2 y entre 0,05 y 0,08 para DENV3. En una forma de realización adicional, las vacunas monovalentes se mezclan a la misma relación de volumen para obtener la vacuna tetravalente contra los serotipos 1, 2, 3, 4 del dengue (atenuada). En una forma de realización adicional, los parámetros usados en el proceso de secado por congelamiento (liofilización) son: congelamiento (entre -30 y -50 °C), vacío (entre 20 y 100 μ bar), secado primario a valores de entre -30 y -50 °C (36 a 42 h) y entre -5 y -10 °C (18 a 24 h) un secado secundario a valores de entre 25 y 29 °C (8 a 15 h).

[16] En otro aspecto, la invención se refiere a una vacuna tetravalente atenuada contra el dengue producida mediante el proceso descrito previamente.

[17] En otro aspecto, la invención se refiere al uso de una composición que comprende fosfato de sodio monobásico dihidratado 0,2 M, fosfato de sodio dibásico heptahidratado, 0,2 M y agua WFI (es decir, agua para inyecciones) para

reconstituir la vacuna producida mediante el proceso descrito previamente. En una forma de realización se utilizan 5 ml de dicha composición para reconstituir la vacuna seca.

[18] En otro aspecto, la invención se refiere a un método para inducir una respuesta inmunológica contra los serotipos 1, 2, 3 y 4 del virus del dengue en un sujeto mediante la administración de la vacuna citada previamente al sujeto. En determinadas formas de realización, el sujeto es un ser humano.

[19] En otro aspecto, la invención se refiere a un conjunto de elementos de una vacuna tetravalente contra el dengue que comprende la vacuna tetravalente liofilizada citada previamente, una composición de reconstitución que comprende fosfato de sodio monobásico dihidrato 0,2 M, fosfato de sodio dibásico heptahidratado, 0,2 M y agua WFI.

[20] En determinadas formas de realización, se proveen procesos para preparar una vacuna tetravalente atenuada contra el dengue que comprende: (i) amplificar las células Vero en cultivo para producir bancos de células Vero maestro y de trabajo, en donde las células Vero se adaptan para su crecimiento en un medio libre de suero, se cultivan en un medio libre de suero, y se subcultivan con una tripsina que no es de origen animal de estas células en frascos de cultivo tisular (TC) de 225 cm² y posteriormente en un Cell Factory System™ (CFS); (ii) infectar células Vero del banco maestro o de trabajo con los serotipos 1, 2, 3 y 4 del virus del dengue de un banco de siembra o de trabajo de cada virus, en donde las células Vero se infectan de manera independiente con los serotipos 1, 2, 3 y 4 del virus del dengue en cultivos separados con medio libre de suero; (iii) incubar los frascos TC de 225 cm² o Cell Factory System™ (CFS) que contienen las células Vero infectadas con cada virus del dengue a 36,5 °C (± 1 °C) por entre 10 y 20 días; (iv) cosechar los sobrenadantes de cada cultivo; (v) filtrar cada suspensión de virus del dengue del paso (iv) a través de una membrana con 0,2 µm de porosidad y guardar el virus del dengue filtrado a -80 °C (± 5 °C); (vi) preparar preparaciones a granel de los serotipos 1, 2, 3 y 4 del virus del dengue; (vii) formular vacunas monovalentes; (viii) formular la vacuna tetravalente mediante mezclado de las vacunas monovalentes; (ix) llenar los viales con la vacuna tetravalente; (x) liofilizar la vacuna tetravalente en los viales; (xi) sellar los

viales con la vacuna tetravalente liofilizada; y (xii) guardar el producto liofilizado y sellado a 2-8 °C, preparando así una vacuna tetravalente atenuada contra el dengue.

[21] En determinadas formas de realización, se provee un proceso para preparar una vacuna tetravalente atenuada contra el dengue que comprende: (i) amplificar las células Vero en cultivo para producir bancos de células Vero maestro y de trabajo, en donde las células Vero se adaptan para su crecimiento en un medio libre de suero, se cultivan en un medio libre de suero y se subcultivan con una tripsina que no es de origen animal; (ii) infectar células Vero del banco maestro o de trabajo con los serotipos 1, 2, 3 y 4 del virus del dengue de un banco de siembra o de trabajo de cada virus, en donde las células Vero se infectan de manera independiente con los serotipos 1, 2, 3 y 4 del virus del dengue en cultivos separados con medio libre de suero; (iii) incubar las células Vero infectadas con cada virus del dengue a 36,5 °C (± 1 °C) por entre 10 y 20 días en un frasco de cultivo tisular o en un Cell Factory System™; (iv) cosechar los sobrenadantes de cada cultivo; (v) filtrar cada suspensión de virus del dengue del paso (iv) a través de una membrana con 0,2 μm de porosidad y guardar el virus del dengue filtrado a -80 °C (± 5 °C); (vi) preparar las preparaciones a granel de los serotipos 1, 2, 3 y 4 del virus del dengue; (vii) formular vacunas monovalentes; y (viii) formular la vacuna tetravalente mediante mezclado de las vacunas monovalentes.

[22] En determinadas formas de realización, se provee una vacuna tetravalente atenuada contra el dengue producida mediante cualquiera de los procesos mencionados precedentemente.

[23] En determinadas formas de realización, se provee un proceso para preparar una vacuna tetravalente contra el dengue para su administración a un sujeto que comprende el paso de reconstituir la vacuna tetravalente contra el dengue sellada y liofilizada producida mediante cualquiera de los métodos mencionados precedentemente en una composición que comprende fosfato de sodio monobásico dihidrato 0,2 M, fosfato de sodio dibásico heptahidratado 0,2 M y agua.

[24] También se proveen métodos para inducir una respuesta inmunológica contra los serotipos 1, 2, 3 y 4 del virus del dengue en un sujeto que

comprenden administrar la vacuna mencionada precedentemente al sujeto.

[25] También se provee un conjuntos de elementos para la vacuna tetravalente contra el dengue que comprende la vacuna mencionada precedentemente, una composición de reconstitución que comprende fosfato de sodio monobásico dihidrato 0,2 M, fosfato de sodio dibásico heptahidratado 0,2 M y agua.

[26] En determinadas formas de realización de cualquiera de los procesos, en las vacunas, los métodos o los conjuntos de elementos mencionados precedentemente, las cepas del virus del dengue usadas son rDEN1Δ30-1545 (SEQ ID N°: 1) o una variante de la misma; rDEN2/4Δ30(ME)-1495,7163 (SEQ ID N°: 2) o una variante de la misma; rDEN3Δ30/31-7164 (SEQ ID N°: 3) o una variante de la misma, y rDEN4Δ30-7132,7163,8308 (SEQ ID N°: 4) o una variante de la misma.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

[27] El propósito de la divulgación, junto con ventajas adicionales de la misma, se comprenderá mejor con referencia a la figura adjunta y las siguientes descripciones:

[28] La Figura 1 es un resumen de la divulgación que describe todos los pasos del proceso para preparar una vacuna tetravalente atenuada contra el dengue.

DESCRIPCIÓN

[29] Aunque la presente invención puede ser susceptible de diferentes formas de realización, en la figura y en la siguiente descripción detallada se muestran algunas determinadas formas de realización, teniendo en cuenta que la presente divulgación puede considerarse como un ejemplo de los principios de la invención y no pretenden limitar el alcance de la invención que se ilustra y divulga en esta descripción.

Proceso para preparar una vacuna tetravalente atenuada contra el dengue

[30] En una primera forma de realización, la presente invención se refiere a un proceso para preparar una vacuna tetravalente atenuada contra el dengue que comprende cualquier subconjunto o todos los siguientes pasos: adaptar células Vero al crecimiento en un medio libre de suero y tripsina que no es de

origen animal; amplificar las células Vero en cultivo de estas células en frascos TC 225 cm² y posteriormente en un Cell Factory System™ (CFS); producir bancos de células Vero maestro y de trabajo y bancos de siembra y de trabajo de serotipos 1, 2, 3 y 4 del virus del dengue; infectar las células Vero contenidas en frascos TC de 225 cm² o CFS con los serotipos 1, 2, 3 y 4 del virus del dengue de los bancos; incubar los frascos TC de 225 cm² o CFS que contienen las células Vero/suspensión viral infectadas con el virus del dengue a 36,5 °C (± 1 °C) por entre 10 y 20 días; cosechar los sobrenadantes de estos cultivos, filtrar estas suspensiones del virus del dengue a través de una membrana con 0,2 µm de porosidad y guardar a -80 °C (± 5 °C); preparar las preparaciones a granel de los serotipos 1, 2, 3 y 4 del virus del dengue; formular vacunas monovalentes con estas preparaciones a granel; formular una vacuna tetravalente mezclando las vacunas monovalentes; llenar, liofilizar; sellar y guardar el producto a 2-8 °C. En una forma de realización adicional, la línea de células Vero utilizada es ATCC CCL-81.4 (cGMPVero, *Kidney African Green Monkey - Cercopithecus aeothlops*; disponible de ATCC, Manassas, VA, EE.UU.). En una forma de realización adicional, las cepas del virus del dengue utilizadas con rDEN1Δ30-1545 (SEQ ID N°: 1) o variantes de la misma; rDEN2/4Δ30(ME)-1495,7163 (SEQ ID N°: 2) o variantes de la misma; rDEN3Δ30/31-7164 (SEQ ID N°: 3) o variantes de la misma; y rDEN4Δ30-7132,7163,8308 (SEQ ID N°: 4) o variantes de la misma. Las variantes de las cepas del virus del dengue mencionadas precedentemente que se pueden usar incluyen, pero en un sentido no taxativo: (1) variantes de rDEN1Δ30-1545 (SEQ ID N°: 1) que tienen un genoma con por lo menos un 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 99,5% de identidad de secuencia por toda la longitud de la SEQ ID N°: 1 y sus variantes con los porcentajes de identidad de secuencia mencionados precedentemente que codifican una poliproteína viral con por lo menos un 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con la poliproteína viral codificada por la SEQ ID N°: 1; (2) variantes de rDEN2/4Δ30(ME)-1495,7163 (SEQ ID N°: 2) que tienen un genoma con por lo menos un 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 99,5% de identidad de secuencia por toda la longitud de la SEQ ID N°: 2 y variantes con los porcentajes de identidad de secuencia mencionados precedentemente que codifican una poliproteína viral con por lo menos un 95%,

96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con la poliproteína viral codificada por la SEQ ID N°: 2; (3) variantes de rDEN3Δ30/31-7164 (SEQ ID N°: 3) que tienen un genoma con por lo menos un 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 99,5% de identidad de secuencia por toda la longitud de la SEQ ID N°: 3 y variantes con los porcentajes de identidad de secuencia mencionados precedentemente que codifican una poliproteína viral con por lo menos un 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con la poliproteína viral codificada por la SEQ ID N°: 3; y (4) variantes de rDEN4Δ30-7132,7163,8308 (SEQ ID N°: 4) que tienen un genoma con por lo menos un 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 99,5% de identidad de secuencia por toda la longitud de la SEQ ID N°: 3 y variantes con los porcentajes de identidad de secuencia mencionados precedentemente que codifican una poliproteína viral con por lo menos un 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con la poliproteína viral codificada por la SEQ ID N°: 4.

[31] La cepa rDEN1Δ30 (GenBank, N° de Acceso: AY145123) es un virus vivo atenuado derivado de la cepa DEN1 Western Pacific (WP) de tipo salvaje por medio de una supresión de 30 nucleótidos (Δ30) en la región no traducida 3' (3'UTR). La cepa rDEN1Δ30-1545 (SEQ ID N°: 1) usada en la presente codifica una sola mutación Lys → Arg en el número de residuo de aminoácido 484 (mutación A1545G) en la poliproteína viral.

[32] Para desarrollar el virus DEN2, se sustituyó la región ME de DEN2 por los genes correspondientes de rDEN4Δ30 para crear la vacuna candidato rDEN2/4Δ30(ME). La cepa rDEN2/4Δ30(ME)-1495,7163 (SEQ ID N°: 2) usada en la presente codifica una mutación Ser → Phe en el número de residuo de aminoácido 186 (mutación C1495T) y una mutación Leu → Phe en el número de residuo de aminoácido 112 (mutación A7163C) en la poliproteína viral.

[33] La cepa rDEN3Δ30/31 es un virus vivo atenuado derivado de la cepa rDEN3Δ30. Inicialmente se construyó una copia de ADNc completa de la cepa DEN3 Sleman/78, mediante la creación de una supresión de 30 nucleótidos (Δ30) en la 3'UTR. En el virus resultante, rDEN3Δ30, se efectuó una supresión adicional de aproximadamente 31 nucleótidos en la 3'UTR [2]. Por ello, rDEN3Δ30/31 incluye la supresión Δ30 original y una supresión de 31 nt no contiguos que elimina ambas estructuras TL-2 y TL-3 originales. La cepa rDEN3Δ30/31-7164

resultante (SEQ ID N°: 3) usada en la presente codifica una mutación Val → Ala en el número de residuo de aminoácido 115 (mutación T7164C) en la poliproteína viral.

[34] rDEN4Δ30 es un virus vivo atenuado derivado del DEN4 Dominica/81 de tipo salvaje usando tecnología de ADN recombinante. Previamente se había eliminado una estructura de tallo-bucle, identificada como TL2 en la estructura secundaria de la 3' UTR mediante supresión de 30 nucleótidos del genoma de DEN4 (3'd 172-143) y luego se la denominó mutación Δ30. La cepa rDEN4Δ30-7132, 7163, 8308 (SEQ ID N°: 4) usada en la presente codifica una mutación Thr → Ile en el número de residuo de aminoácido 102 (mutación C7132T), una mutación Leu → Phe en el número de residuo de aminoácido 112 (mutación A7163C) y una mutación Lys → Arg en el número de residuo de aminoácido 249 (mutación A8308G) de la poliproteína viral.

[35] En una forma de realización adicional, la MOI de las cepas del virus del dengue para cada serotipo del dengue varía aproximadamente: entre 0,01 y 0,03 para DENV 1 y 4, entre 0,02 y 0,04 para DENV 2 y entre 0,05 y 0,08 para DENV3. En una forma de realización adicional, las vacunas monovalentes se mezclan a la misma relación de volumen para obtener la vacuna tetravalente contra los serotipos 1, 2, 3, 4 del dengue (atenuada). En una forma de realización adicional, los parámetros usados en el proceso de secado por congelamiento son: congelamiento (entre -30 y -50 °C), vacío (entre 20 y 100 μbar), secado entre -30 y -50 °C (36 a 40 h), entre -5 y -10 °C (18 a 24 h) y entre 25 y 29 °C (8 a 15 h). En determinadas formas de realización, la adaptación de las células Vero al medio libre de suero se llevó a cabo con el pasaje 123; el banco de células de trabajo con el pasaje 134; y en el proceso de producción de virus del dengue se emplearon células Vero con los pasajes 138 a 149.

[36] En determinadas formas de realización, se usa un estabilizante antes del paso (vii) de formulación de vacunas monovalentes. Los estabilizantes adecuados para algunas formas de realización de la presente invención incluyen, pero en un sentido no taxativo, trehalosa, sacarosa, maltosa, lactosa, galactosa, ASO4 (un sistema estabilizante que incluye una mezcla de hidróxido de aluminio estable y monofosforil lípido A), albúmina de suero humano (HSA), copolímeros de

bloques de Pluronic® F127, F68 (BASF), P85 (BASF) y P123 (BASF), el polisacárido quitosán y HSA recombinante (rHSA) [8, 9].

Vacuna tetravalente atenuada contra el dengue

[37] En otra forma de realización, la presente invención se refiere a una vacuna tetravalente atenuada contra el dengue producida mediante el proceso descrito previamente.

Uso de una composición para reconstituir la vacuna seca

[38] En otra forma de realización, se usa una composición que comprende fosfato de sodio monobásico dihidrato 0,2 M, fosfato de sodio dibásico heptahidratado, 0,2 M y agua WFI para reconstituir la vacuna descrita previamente. En una forma de realización adicional se usaron 5 ml de la composición para reconstituir la vacuna seca.

Método para inducir una respuesta inmunológica contra los serotipos 1, 2, 3 y 4 del virus del dengue en un paciente

[39] En otra forma de realización la presente invención se refiere a un método para inducir una respuesta inmunológica contra los serotipos 1, 2, 3 y 4 del virus del dengue en un sujeto mediante la administración de la vacuna descrita previamente al sujeto.

[40] Para el tratamiento profiláctico contra una infección por Dengue, se pretende que la vacuna de la presente invención se pueda administrar antes de la exposición de un individuo a los serotipos 1-4 virus del dengue y que la respuesta inmunológica resultante permita inhibir o reducir la severidad de la infección por Dengue.

Conjunto de elementos de la vacuna tetravalente contra el dengue

[41] En otra forma de realización, la presente invención se refiere a un conjunto de elementos de una vacuna tetravalente contra el dengue que comprende la vacuna descrita previamente, una composición de reconstitución que comprende fosfato de sodio monobásico dihidrato 0,2 M, fosfato de sodio dibásico heptahidratado, 0,2 M y agua WFI.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: DESCRIPCIÓN DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN

[42] El proceso de producción de la vacuna 1,2,3,4 (atenuada) contra el

dengue comprende los siguientes pasos:

[43] PASO 1: Preparación de los medios de cultivo y las soluciones utilizadas en el proceso de producción de la vacuna

[44] Los medios de cultivo libres de suero para el mantenimiento de las células Vero, para la preparación de preparaciones a granel y para la formulación de las vacunas se preparan de la siguiente manera:

[45] Medios libres de suero VP-SFM AGT o AGT OptiPRO® (GIBCO): se diluye un frasco de medio de cultivo en polvo en agua WFI y se le agrega L-glutamina de modo tal que al final, hay 200 mM de este reactivo en el medio de cultivo. El medio se esteriliza mediante filtración a través de una membrana de 0,2 µm y se toman muestras para la medición del pH y las pruebas de esterilidad.

[46] Medio de cultivo Leibovitz (L-15) sin rojo fenol: el medio de cultivo en polvo se diluye en los frascos que lo contiene con agua WFI. A continuación, el medio se filtra a través de una membrana de 0,2 µm. Se toman muestras para las pruebas de esterilidad, endotoxinas bacterianas, pH y aspecto.

[47] Los medios de cultivo filtrados se empaquetan en frascos de policarbonato y se guardan a 2-8 °C.

[48] La solución amortiguadora salina con fosfato 0,02 M está compuesto por cloruro de sodio, fosfato de sodio dibásico, fosfato de potasio monobásico y agua WFI. Esta solución se usa para lavar los cultivos durante el proceso de amplificación celular y en la concentración de las suspensiones del virus del dengue.

[49] PASO 2: Preparación de los bancos maestro y de trabajo de células Vero

[50] Los bancos de células Vero se obtuvieron por adaptación de las células Vero, línea ATCC CCL-81.4 (por ejemplo, cGMPVero, *Kidney African Green Monkey - Cercopithecus aeothrops* p. 123 Lote 7388125) al cultivo en un medio libre de suero y tripsina que no es de origen animal. Esta adaptación se llevó a cabo por sucesivos subcultivos de estas células en frascos T para cultivo celular de 225 cm² para el cultivo celular usando el medio libre de suero (VP-SFM AGT® - GIBCO) y tripsina recombinante (TrypLE Select® - Gibco). Después de la adaptación de las células que solamente crecen en medio con suero para su

crecimiento en un medio libre de suero, los cultivos que crecían en un medio libre de suero se utilizan para preparar los bancos de células.

[51] En la preparación de los bancos de células maestro y de trabajo, las células Vero adaptadas contenidas en frascos de cultivo con una confluencia de entre 90 y 100% se desprenden con tripsina, se suspenden en medio OptiPRO AGT (Gibco), se centrifugan y el pélet se resuspende en el mismo medio que contiene 5% de DMSO. La suspensión de células se homogeneiza y se distribuye en criotubos que contienen entre 4 y 10×10^6 células/ml. Los criotubos se colocan en un congelador a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$), durante 48 horas y luego se guardan en nitrógeno líquido. Se toman muestras para la certificación de bancos que incluye las siguientes pruebas de control de calidad: esterilidad, determinación del cariotipo, Identidad celular, agentes adventicios en células y animales, virus y micoplasmas hemadsorbentes.

[52] PASO 3: Amplificación de las células Vero utilizadas como sustrato celular en la producción del virus del dengue

[53] El proceso de amplificación celular incluye descongelar un criotubo que contiene células Vero de una célula de origen (ATCC - CCL81.4) o de bancos maestro o de trabajo en un baño de agua a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$). Después del descongelamiento, la suspensión de las células Vero se coloca en un frasco T con medio libre de suero y se incuba a $36,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) hasta que la cobertura de la monocapa de células comprende entre 90 y 100% del área de cultivo del frasco T. Los frascos se retiran del incubador y las células son sometidas a un subcultivo nuevo. En este proceso, la monocapa de células se lava con solución amortiguadora salina con fosfato 0,02 M y se desprende con tripsina recombinante (Tryple Select® - GIBCO). Las células se suspenden en un medio libre de suero y se dividen entre frascos TC que contienen el mismo medio. Los frascos TC se incuban nuevamente a $36,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) hasta alcanzar una cobertura de entre 90 y 100% y luego se subcultivan adicionalmente. La amplificación de las células tiene lugar inicialmente en frascos TC de 225 cm^2 y posteriormente en un Cell Factory System™ (CFS) con 10 capas de bandejas.

[54] PASO 4: Preparación de los bancos de trabajo del virus del dengue DEN1, DEN2, DEN3 y DEN4

[55] Los frascos TC con 225 cm² de área de cultivo que contienen las células Vero amplificadas se infectan con las cepas del virus del dengue rDEN1Δ30-1545 (SEQ ID N°: 1); rDEN2/4Δ30(ME)-1495,7163 (SEQ ID N°: 2); rDEN3Δ30/31-7164 (SEQ ID N°: 3); y rDEN4Δ30-7132,7163,8308 (SEQ ID N°: 4), por separado. La MOI (*multiplicidad de infección*) usada para la infección del virus es diferente para cada serotipo: entre 0,01 y 0,03 para DENV 1 y DENV 4, entre 0,02 y 0,04 para DENV 2 y entre 0,05 y 0,08 para DENV3. Los cultivos infectados se incuban a 36,5 °C (± 1 °C). Después de 8 días de incubación, los sobrenadantes de los cultivos infectados con DEN1Δ30, DEN2/4Δ30(ME)-1495,7163, DEN3Δ30/31-7164 y DEN4Δ30-7132,7163,8308 se cosechan por separado, se filtran a través de una membrana esterilizante y se guardan en un congelador a -80 °C (± 5 °C). Se reemplaza el medio de cultivo de los frascos y los frascos se incuban nuevamente a 36,5 °C (± 1 °C). Este procedimiento se repite guante tres días consecutivos para producir al final cuatro muestras de los sobrenadantes. Para los cultivos infectados con DEN3, este procedimiento comienza el día 10 de incubación. Se toman muestras de cada cosecha de sobrenadante de los cultivos para las pruebas de esterilidad y titulación del virus.

[56] En la preparación de los bancos de trabajo, se mezclan las cosechas que aprobaron las pruebas de esterilidad, con títulos superiores a los 10^{5,0} PFU/ml, se distribuyen en criotubos con 2 a 4 ml y se mantienen en nitrógeno líquido. El banco se usa después de haber sido aprobado en las siguientes pruebas: identidad viral, esterilidad, titulación, agentes adventicios en células y animales, virus y micoplasmas hemadsorbentes.

[57] PASO 5: Producción de los serotipos 1, 2, 3 y 4 del virus del dengue para la formulación de la vacuna contra el dengue

[58] Después de la amplificación, las células Vero contenidas en frascos TC o Cell Factory System™ obtenidas del proceso de amplificación, descrito en el paso 3, se tripsinizan y se suspenden en un medio libre de suero (OptiPRO® AGT - GIBCO). La suspensión de células Vero obtenida se inocula con las cepas del virus del dengue rDEN1Δ30-1545, rDEN2/4Δ30(ME)-1,495,7163, rDEN3Δ30/31-7164 y rDEN4Δ30-7132,7163,8308, de los bancos de virus del dengue preparados en el paso 4 del proceso de producción de la vacuna contra el dengue. Para la

inoculación se usan los diferentes MOI (*Multiplidad de Infección*) para cada serotipo: entre 0,01 y 0,03 para DENV 1 y DENV 4, entre 0,02 y 0,04 para DENV 2 y entre 0,05 y 0,08 para DENV3. Después de la inoculación, la suspensión de virus/células se agita a 32 °C (± 1 °C) por entre 30 y 60 minutos y luego se distribuye en frascos TC de 225 cm² o CFS con 10 capas de bandejas. Se agrega el medio de cultivo libre de suero a los cultivos hasta alcanzar un volumen de entre 100 y 150 ml en el frasco TC y entre 1.200 y 1.800 ml para el CFS. Para el CFS con diferentes cantidades de capas de bandejas, se calcula el volumen de medio de cultivo que se deberá agregar mediante la aplicación de una regla de tres. Los cultivos se incuban a 36,5 °C (± 1 °C). El 8º o 10º día de incubación, se retira entre un 50% y 60% del medio y se agrega el mismo volumen de medio libre de suero a los cultivos. Los cultivos se incuban nuevamente a 36,5 °C (± 1 °C). La cosecha de los sobrenadantes de los cultivos de células Vero infectada se efectúa entre el día 10 y 20 después de la inoculación del virus del dengue.

[59] El proceso de cosecha incluye la eliminación de los sobrenadantes de los cultivos infectados en los frascos TC o CFS, el mezclado de los sobrenadantes cosechados, una filtración estéril de esta mezcla, la distribución de la suspensión de virus del dengue filtrada en frascos de polipropileno/policarbonato y almacenamiento en un congelador a -80 °C (± 5 °C). Se toman muestras para las pruebas de esterilidad y titulación viral. Después de su aprobación en las pruebas, los frascos con la suspensión del virus del dengue se retiran del congelador y se emplean en el proceso de concentración.

[60] La suspensión de virus del dengue cosechada se descongelan y se concentran mediante un proceso de filtración tangencial usando un sistema Pellicon® (Millipore) con una membrana de entre 30 y 50 kDa de porosidad. Se toman muestras para las pruebas de control de calidad: titulación viral y esterilidad. El concentrado viral (C1) de rDEN1Δ30-1545, rDEN2/4Δ30(ME)-1495,7163, rDEN3Δ30/31-7164 o rDEN4Δ30-7132,7163,8308 se denomina C1 y se guarda a -80 °C (± 5 °C).

[61] PASO 6: Preparación de preparaciones a granel del virus del dengue

[62] El concentrado del virus del dengue C1 (rDEN1Δ30-1545, rDEN2/4Δ30(ME)-1495,7163, rDEN3Δ30/31-7164, o rDEN4Δ30-7132,7163,8308)

se retira del congelador a -80 °C (± 5 °C), se descongela y es sometido al siguiente proceso: el concentrado del virus se diluye con medio Leibovitz sin rojo fenol y el factor de dilución usado es de 5 a 10 veces su volumen inicial. El concentrado diluido se concentra nuevamente mediante filtración tangencial (sistema Pellicon) hasta un volumen que es 2,5 a 3 veces su volumen inicial. Este concentrado se denomina C2.

[63] El concentrado C2 se filtra a través de una membrana con 0,2 µm de porosidad, se distribuye en tubos/frascos y se guarda en un congelador a -80 °C (± 5 °C). Se toman muestras para las pruebas de control de calidad (esterilidad y endotoxinas bacterianas, micoplasmas, agentes adventicios en células, virus hemadsorbentes, identidad y titulación viral). Después de su aprobación en las pruebas de control de calidad, la preparación a granel se emplea para la formulación de una vacuna monovalente.

[64] Los lotes de las preparaciones a granel del virus del dengue producidos en 2013 y 2014 se muestran en la tabla 1.

Tabla 1: Preparaciones a granel de los virus del dengue rDEN1Δ30-1545, rDEN2/4Δ30(ME)-1495,7163, rDEN3Δ30/31-7164 y rDEN4Δ30-7132,7163,8308 producidos en 2013 y 2014.

Preparaciones a granel	Lotes	N° de frascos	Título viral, Log ₁₀ PFU/ml	Pruebas de control de calidad	
				Endotoxinas bacterianas (UE/ml)	Otras pruebas
IB-DEN1Δ30/Vero/M	01/13	18	6,8	<1,25	Aprobadas
	02/13	40	5,8	<1,25	Aprobadas
	01/14	43	6.4	<0,50	Aprobadas
	02/14	16	6.9	<0,73	Aprobadas
	03/14	24	6,1	<0,51	Aprobadas
	04/14	26	6,8	<0,50	Aprobadas
IB-DEN2/4Δ30/Vero/M	01/13	19	5,7	<1,25	Aprobadas
	02/13	32	5.9	<1,25	Aprobadas
	01/14	39	6.4	<0,50	Aprobadas
	02/14	21	7,0	4.43	Aprobadas
	03/14	21	7,0	<0,50	Aprobadas
	04/14	40	6,5	<0,50	Aprobadas
IB-DEN3Δ30/31Vero/M	01/13	17	6,1	<1,25	Aprobadas
	02/13	45	6,1	<1,25	Aprobadas
	02/14	22	6,8	<0,50	Aprobadas
	03/14	23	6,6	<0,50	Aprobadas
	01/13	50	5.9	<1,25	Aprobadas
	02/13	35	6.3	<1,25	Aprobadas
IB-	01/14	23	6.9	0,68	Aprobadas

DEN4Δ30/Vero/M					
	02/14	19	6,0	<0,50	Aprobadas
	03/14	30	6,8	0,68	Aprobadas

PS: Un valor de endotoxina de hasta 50 UE/ml es considerado satisfactorio, dado que en el producto final debe ser menor o igual a 10 UE/ml.

[65] PASO 7: Formulaciones de las vacunas monovalentes rDEN1Δ30-1545, rDEN2/4Δ30(ME)-1495,7163, rDEN3Δ30/31-7164 y rDEN4Δ30-7132,7163,8308 y vacuna contra los serotipos 1,2,3,4 (atenuada) del dengue

[66] Se formulan cuatro vacunas monovalentes contra el dengue, una para cada tipo de virus del dengue (rDEN1Δ30-1545, rDEN2/4Δ30(ME)-1495,7163, rDEN3Δ30/31-7164 y rDEN4Δ30-7132,7163,8308). Los cálculos para la formulación consisten en determinar un factor de dilución tal que se proveen las siguientes cantidades de vacunas monovalentes de acuerdo con cada serotipo: $5,7 \pm 0,2$, $5,6 \pm 0,2$, $6,1 \pm 0,2$ y $5,8 \pm 0,2$ Log₁₀PFU/ml para DENV1, DENV2, DENV3 y DENV4, respectivamente.

[67] La fórmula para determinar el factor de dilución es: antilogaritmo del título de la preparación a granel (Log₁₀ PFU/ml) dividido por el antilogaritmo del título viral (Log₁₀ PFU/ml) deseado para cada tipo monovalente. Las formulaciones monovalentes de rDEN1Δ30-1545, rDEN2/4Δ30(ME)-1495,7163, rDEN3Δ30/31-7164 y rDEN4Δ30-7132,7163,8308 se elaboran con medio de Leibovitz (L-15) sin rojo fenol concentrado al doble, es decir, el medio conserva sus componentes originales concentrados al doble.

[68] Para elaborar la formulación de la vacuna contra los serotipos 1, 2, 3, 4 del dengue (atenuada), se mezclan las vacunas monovalentes 1, 2, 3 y 4 a una misma relación de volumen. Después de homogenizar la vacuna tetravalente formulada, el producto es sometido a filtración (membrana con 0,2 μm de porosidad) y se toman muestras para las siguientes pruebas de control de calidad: esterilidad, endotoxinas bacterianas, titulación viral, pH y aspecto del producto.

[69] PASO 8: Llenado, liofilización y sellado de la vacuna tetravalente contra el dengue.

[70] Después de formular la vacuna tetravalente contra el dengue, el producto se usa para llenar viales con 3 ml de vacuna. Se toman muestras de los viales llenos para las pruebas de control de calidad (esterilidad, endotoxina

bacteriana, titulación viral, aspecto y pH).

[71] Después del llenado, los viales son transportados al liofilizador y se inicia el proceso de secado por congelamiento. En este proceso, se establecen los siguientes parámetros: congelamiento (entre -30 y -50 °C), vacío (entre 20 y 100 µbar), secado entre -30 y -50 °C (36 a 40 h), entre -5 y -10 °C (18 a 24 h) y entre 25 y 29 °C (8 a 15 h).

[72] Al final del proceso de secado por congelamiento, los viales con la vacuna liofilizada son sometidos a un proceso de sellado. El producto final, la vacuna contra el dengue 1, 2, 3, 4 (atenuada), se guarda a 2-8 °C. Se toman muestras del lote de vacuna para evaluarlas en pruebas esterilidad, endotoxinas bacterianas, titulación viral, aspecto del producto antes y después de la reconstitución con el diluyente, pH, ADN residual y humedad residual.

[73] El producto se puede denominar vacuna contra los serotipos 1, 2, 3, 4 (atenuada) del dengue, según las regulaciones de Brasil para la designación de vacunas.

[74] El producto se puede reconstituir con 5,0 ml del diluyente específico en esta vacuna (mezcla de fosfatos de sodio), que corresponde a 10 dosis/0,5 ml/vial. Cada dosis contiene entre 10^{2,7} y 10^{3,7} PFU/dosis de cada uno de los virus del dengue usados en la formulación de la vacuna 1,2,3,4 (atenuada) contra el dengue. Los resultados de las pruebas de control de calidad obtenidos de seis lotes producidos en el 2014 se muestran en la tabla 2.

Tabla 2: Lotes de vacunas contra los serotipos 1, 2, 3, 4 contra el dengue (atenuadas) producidas en 2014.

Lotes	Resultados de las pruebas de control de calidad								
	Título viral Log ₁₀ /PFU/dosis				Endotoxinas bacterianas (UE/ml)	PH	ADN residual (pg/dosis)	Humedad residual, %	Aspecto del producto estéril
	DEN1	DEN2	DEN3	DEN4					
01/14	3,0	3,4	3,0	3,2	<0,500	6,9	32,6	1,33	Aprobado
02/14	2,7	3,1	2,8	3,2	<0,500	6,9	27,2	2,01	Aprobado
03/14	3,1	3,2	2,9	3,2	<0,500	6,9	52,6	1,99	Aprobado
04/14	3,2	3,6	3,1	3,6	0,956	6,9	40,8	0,89	Aprobado
05/14	3,5	3,6	3,0	3,5	1,030	6,9	31,5	0,52	Aprobado
06/14	3,4	3,5	3,5	3,4	<0,500	6,9	35,1	0,35	Aprobado

Valores para la aprobación del lote: Endotoxinas bacterianas = 10 UE/ml; Titulación viral = entre 10^{2,7} y 10^{3,7} PFU/dosis; pH = entre 6,8 y 7,2; ADN celular residual ≤100 pg/dosis; Humedad residual ≤3%; Aspecto del producto antes de la reconstitución: ligeramente amarillento (torta homogénea (SYHC) y aspecto del

producto después de la reconstitución: líquido translúcido ligeramente amarillento (SYCL).

III DILUYENTE PARA LA RECONSTITUCIÓN DE LA VACUNA CONTRA EL DENGUE 1, 2, 3, 4 (ATENUADA)

Composición:

Para la preparación de 1.000 ml

Solución 1 (fosfato de sodio monobásico dihidratado 0,2 M)	195 ml
Solución 2 (fosfato de sodio dibásico heptahidratado, 0,2 M)	0,5 ml
Agua WFI csp	1.000 ml

[75] Presentación: viales o ampollas con 5,0 ml

IV ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DE LA VACUNA CONTRA EL DENGUE 1, 2, 3, 4 (ATENUADA)

ESTUDIOS DE ESTABILIDAD a 2-8 °C

[76] Los resultados de las pruebas que se llevaron a cabo con las muestras de tres lotes de vacuna contra el dengue 1, 2, 3, 4 (atenuada) guardados a 2-8 °C se muestran en las tablas 3 y 4.

Tabla 3: Resultados de las pruebas de esterilidad y fisicoquímicas observados para los lotes de vacunas contra el dengue 1, 2, 3, 4 (atenuada) guardadas a 2-8

Lotes de vacuna	Meses de almacenamiento 2-8 °C	Resultados de las muestras			
		Esterilidad	pH	Aspecto antes y después de la reconstitución	Humedad residual (%)
01/10	12	Aprobada	7,1	SYHC y SYCL	2,91
02/10	12	Aprobada	7,1	SYHC y SYCL	2,79
01/11	12	Aprobada	7,1	SYHC y SYCL	2,48

SYHC: torta seca homogénea ligeramente amarillenta. SYCL: líquido translúcido ligeramente amarillento.

III DILUYENTE PARA LA RECONSTITUCIÓN DE LA VACUNA CONTRA EL DENGUE 1, 2, 3, 4 (ATENUADA)

Composición:

[77] El análisis de los resultados de la Tabla 3 indica que hasta por al menos un año de almacenamiento los títulos de los serotipos 1, 2, 3 y 4 del virus del dengue permanecieron satisfactorios. Después de 18 meses de

almacenamiento a 2-8 °C, los títulos de DENV3 y DENV4 cayeron por debajo del mínimo requerido ($10^{2,7}$ PFU/dosis de vacuna).

Tabla 4: Resultados de los títulos de los componentes de virus del dengue de la vacuna contra el dengue 1, 2, 3, 4 (atenuada) guardada a 2-8 °C.

Lotes de vacuna	Serotipos	Títulos del virus del dengue (Log ₁₀ PFU/dosis)					
		Meses de almacenamiento a 2-8 °C					
		0	3	6	9	12	18
01/10	DEN1	3,1	3,2	3,3	3,3	3,1	3,0
	DEN2	3,1	3,2	3,3	3,3	3,1	3,0
	DEN3	3,2	3,3	3,1	3,1	3,2	2,0
	DEN4	3,3	3,4	3,4	3,4	3,3	2,8
02/10	DEN1	3,1	3,1	3,6	3,3	3,1	3,2
	DEN2	3,2	3,2	3,3	3,3	3,2	3,0
	DEN3	3,2	3,2	3,1	3,1	3,1	2,2
	DEN4	3,2	3,2	3,4	3,4	3,2	2,2
01/11	DEN1	3,1	3,4	3,1	3,1	3,1	3,0
	DEN2	3,2	3,3	3,1	3,0	3,0	3,0
	DEN3	3,2	3,1	3,1	3,1	3,0	2,4
	DEN4	3,1	3,1	3,1	3,0	3,0	1,7

REFERENCIAS

[1] Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL et.al 2013. The global distribution and burden of dengue. Nature;496: 504-507.

[2] Brady OJ, Gething PW, Bhatt S, Messina JP, Brownstein JS, Hoen AG et al., Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6: e1760. doi:10.1371/journal.pntd.0001760.

[3] Ministério da Saúde Brazil. Boletim Epidemiológico. Monitoramento de casos de dengue. Vol. Nº 11.2015 in <http://portalsaude.gov.br/index.php/situacao.e>

[4] Ishikawa, T.; Yamanaka, A.; Konishi E. 2014. A review of successful flavivirus vaccines and the problems with those flaviviruses for which vaccines are not yet available. Vaccine. 32: 1326-1337.

[5] WHO (World Health Organization). Dengue vaccines. In the world wide web internet site “who.int/immunization/research/development/dengue_vaccines/en/” [consultado el 30 Abril 2015].

[6] Durbin AP, Karron RA, Sun W, Vaughn DW, Reynolds MJ, Perreault JR, Thumar B, Men R, Lai CJ, Elkins WR, Chanock RM, Murphy BR, Whitehead SS.

Attenuation and immunogenicity in humans of a live dengue virus type-4 vaccine candidate with a 30 nucleotide deletion in its 3'-untranslated region. *AM. J. Trop. Med. Hyg.* (2001) Nov 65(5): 405-13.

[7] Whitehead SS, Falgout B, Hanley KA, Blaney Jr JE Jr, Markoff L, Murphy BR. A live, attenuated dengue virus type 1 vaccine candidate with a 30-nucleotide deletion in the 3' untranslated region is highly attenuated and immunogenic in monkeys. *J. Virol.* (2003) Jan 77(2): 1653-7.

[8] Wiggan O'Neil, Livengood JA, Silengo SJ, Kinney RM , Osorio JE, Huang CYH, Stinchcomb DT. Novel formulations enhance the thermal stability of live-attenuated flavivirus vaccines. *Vaccine* 29 (2011) 7456– 7462.

[9] Burke CJ, Hsu T-A, Volkin DB. Formulation, Stability and Delivery of Live Attenuated Vaccines for Human Use. *Critical Review in Therapeutic Drug Carrier Systems* (1999) 16(1): 1-8.

[78] Habiendo descrito algunas formas de realización de la invención, en especialista en el arte podrá apreciar en las reivindicaciones adjuntas que es posible efectuar muchas modificaciones y variaciones de la presente invención a la luz de las divulgaciones precedentes. Por lo tanto, se comprenderá que, dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas y la divulgación provista en la presente, la invención se puede practicar según modos distintos de los que se describen específicamente en algunas formas de realización.