

VACUNA DE VIRUS DE ZIKA ATENUADO VIVO

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] La presente solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de EE.UU. No. 62/307,170, presentada el 11 de marzo de 2016, titulada “VACUNA DE VIRUS DE ZIKA ATENUADO VIVO”, la cual se incorpora acá por referencia en su totalidad par todos los propósitos.

FINANCIACION GUBERNAMENTAL

[0002] La investigación que soporta esta solicitud fue llevada a cabo por los Estados Unidos de América representado por el Secretario del Departamento de Salud y Servicios Humanos. El Gobierno de los Estados Unidos tiene ciertos derechos en esta invención.

INCORPORACION POR REFERENCIA

[0003] En cumplimiento con 37 C.F.R. Sección 1.52(e)(5), la información de secuencia contenida en el archivo electrónico: 1420378_442WO2_Sequence_Listing_ST52.txt; tamaño 146 KB; creado el: 9 de marzo de 2017; usando Patent-In 3.5, y Checker 4.4.0 se incorpora acá por referencia en su totalidad.

ANTECEDENTES

[0004] 1. Campo de la Divulgación

[0005] La presente divulgación se relaciona con virus de Zika inmunogénicos atenuado y quimeras de virus Zika (o “ZIKV”) contruidos sobre un núcleo del virus del dengue para la producción de vacunas inmunogénicas, vivas, atenuadas de ZIKV, y para la inclusión en una composición de vacuna multivalente (por ejemplo,

pentavalente) que es inmunogénica contra uno o más flavivirus (por ejemplo, un virus de dengue y un ZIKV).

[0006] 2. Antecedentes

[0007] ZIKV pertenece a la familia Flaviviridae y específicamente al gen *Flavivirus*,

5 el cual incluye numerosos virus relacionados con patógenos humanos importantes, incluyendo virus del oeste del Nilo, virus de dengue, y virus de fiebre amarilla. Los flavivirus se caracterizan típicamente como virus envueltos que tienen una geometría de icosaedro y/o esférica con un diámetro de aproximadamente 50 nm por virión. Los genomas de flavivirus comprenden un genoma de ARN en sentido
10 positivo lineal (ver Fig. 1A) de aproximadamente 10-11 kilobases en longitud y que contiene un marco de lectura abierto largo simple que codifica tres principales proteínas estructurales virales (proteínas cápside (C), premembrana/membrana (prM) y envoltante (E)) y por lo menos siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5). Las proteínas estructurales y no estructurales se
15 traducen como una poliproteína simple. La poliproteína luego es procesada por proteasas celulares y virales para formar los polipéptidos virales individuales. Adicionalmente, los genomas de flavivirus también contienen regiones no codificadas 5' conservadas (NCR o región sin trasladar (5' UTR)) de aproximadamente 100 nucleótidos (nt) en longitud y un 3' UTR de aproximadamente
20 400-800 nucleótidos en longitud que contiene varios cuerpos conservados y estructuras en ciclo que están, en parte, involucradas en la replicación de virus.

[0008] La infección por ZIKV ha sido históricamente sólo conocida por causar síntomas suaves en humanos. Adicionalmente, las infecciones por ZIKV se observaron generalmente en regiones geográficas limitadas ubicadas cerca del
25 ecuador entre África y Asia. Sin embargo, el virus ahora se considera que está vinculado con la microcefalia infantil y aborto espontáneo en mujeres embarazadas, y ha expandido su alcance geográfico. El Zika ahora se ha esparcido a México, América Central y del Sur, y el Caribe. Los Centros para el Control de Enfermedades

(CDC) ahora han reportado que las infecciones por Zika en América del Sur han alcanzado niveles pandémicos.

[0009] Como otros flavivirus, el ZIKV es principalmente transmitido de persona a persona por mosquitos como un vector. En particular, el ZIKV es transmitidos por las especies hembra conocidas como *Aedes aegypti*, pero se ha detectado en otras numerosas especies de mosquitos en el gen *Aedes*, incluyendo *A. africanus*, *A. furcifer*, y *A. hensilli*. También se considera ahora que las infecciones por Zika también pueden ser transmitidas sexualmente.

[0010] Aunque existen vacunas efectivas para otros flavivirus, tal como dengue, fiebre amarilla, encefalitis transmitida por garrapata, y encefalitis Japonesa, aún no se encuentra disponible una vacuna efectiva contra ZIKV. Dado el estado actual del brote global, hay una necesidad inmediata en el estado del arte por desarrollar una vacuna efectiva anti-Zika.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0011] La presente divulgación se relaciona con virus de Zika inmunogénicos atenuados y quimeras de ZIKV contruidos sobre el núcleo de un virus de dengue para la producción de vacunas de ZIKV atenuadas, vivas, inmunogénicas, y para la inclusión en una vacuna multivalente (por ejemplo, pentavalente) que es inmunogénica contra uno o más flavivirus (por ejemplo, un virus de dengue y un ZIKV).

[0012] De acuerdo con un aspecto, la presente divulgación suministra un genoma de ZIKV modificado para contener una o más mutaciones de atenuación (por ejemplo, mutaciones de punto, inserciones, eliminaciones, inversiones, o cualquier combinación de los mismos).

[0013] De acuerdo con un aspecto adicional, la presente divulgación suministra un genoma ZIKV quimérico que comprende una porción de un genoma ZIKV y una porción del genoma de al menos otro flavivirus, tal como, pero no limitado a, virus

de dengue (por ejemplo, DEN1, DEN2, DEN3, o DEN4), virus del oeste del Nilo, virus de fiebre amarilla, virus de encefalitis Japonesa, virus de encefalitis transmitida por garrapatas, o combinaciones de los mismos.

[0014] De acuerdo con otro aspecto, la presente divulgación suministra un virión de
5 ZIKV (es decir, partícula de virus) que comprende un genoma de ZIKV modificado para contener una o más mutaciones de atenuación.

[0015] De acuerdo con un aspecto adicional, la presente divulgación suministra un virión de ZIKV (es decir, partícula de virus) que comprende un genoma de ZIKV quimérico que comprende una porción de un genoma de ZIKV y una porción del
10 genoma de al menos otro flavivirus, tal como, pero no limitado a, virus de dengue (por ejemplo, DEN1, DEN2, DEN3, o DEN4), virus del oeste del Nilo, virus de fiebre amarilla, virus de encefalitis Japonesa, virus de encefalitis transmitida por garrapatas, o combinaciones de los mismos.

[0016] De acuerdo con un aspecto, la presente divulgación suministra una
15 composición inmunogénica o vacuna que comprende un ZIKV atenuado. La atenuación puede ser el resultado del genoma del ZIKV que comprende una o más mutaciones y/o eliminaciones de atenuación.

[0017] De acuerdo con un aspecto particular, la presente divulgación suministra una composición inmunogénica o vacuna que comprende un ZIKV quimérico atenuado.
20 El ZIKV quimérico tiene un genoma que comprende una porción de un genoma ZIKV y una porción del genoma de al menos otro flavivirus, tal como, pero no limitado a, virus de dengue (por ejemplo, DEN1, DEN2, DEN3, o DEN4), virus del oeste del Nilo, virus de fiebre amarilla, virus de encefalitis Japonesa, virus de encefalitis transmitida por garrapatas, o combinaciones de los mismos.

25 [0018] De acuerdo con otro aspecto, la presente divulgación suministra un kit farmacéutico que comprende una composición o vacuna inmunogénica. La vacuna puede comprender un ZIKV atenuado. La atenuación puede resultar del genoma del ZIKV que comprende una o más mutaciones y/o eliminaciones de atenuación, junto

con un conjunto de instrucciones para utilizar la composición para vacunar a un sujeto.

[0019] De acuerdo con un aspecto adicional, la presente divulgación suministra un kit farmacéutico que comprende una composición o vacuna inmunogénica. La

5 vacuna comprende un ZIKV quimérico atenuado que tiene un genoma que comprende una porción de un genoma de ZIKV y una porción del genoma de al menos un otro flavivirus, tal como, pero no limitado a, virus de dengue (por ejemplo, DEN1, DEN2, DEN3, o DEN4), virus del oeste del Nilo, virus de fiebre amarilla, virus de encefalitis Japonesa, virus de encefalitis transmitida por garrapatas, o
10 combinaciones de los mismos, junto con un conjunto de instrucciones para utilizar la composición para vacunar a un sujeto.

[0020] De acuerdo con un aspecto, la presente divulgación suministra un método para vacunar un sujeto para suministrar inmunidad contra ZIKV. El método comprende administrar una dosis farmacéuticamente aceptable de una vacuna de
15 ZIKV. La vacuna comprende un ZIKV atenuado. La atenuación es el resultado del genoma del ZIKV que comprende una o más mutaciones y/o eliminaciones de atenuación.

[0021] De acuerdo con un aspecto, la presente divulgación suministra un método para vacunar un sujeto para suministrar inmunidad contra ZIKV. El método
20 comprende administrar una dosis farmacéuticamente aceptable de vacuna de ZIKV. La vacuna puede comprender un ZIKV quimérico atenuado que tiene un genoma que comprende una porción de un genoma de ZIKV y una porción del genoma de al menos otro flavivirus, tal como, pero no limitado a, virus de dengue (por ejemplo, DEN1, DEN2, DEN3, o DEN4), virus del oeste del Nilo, virus de fiebre amarilla, virus
25 de encefalitis Japonesa, virus de encefalitis transmitida por garrapatas, o combinaciones de los mismos.

[0022] De acuerdo con un aspecto adicional, la presente divulgación suministra un método para fabricar una vacuna que comprende un ZIKV atenuado, en donde dicha

atenuación es el resultado del genoma del ZIKV que comprende una o más mutaciones y/o eliminaciones de atenuación. El método para fabricar comprende introducir por lo menos una mutación y/o eliminación de atenuación en el genoma del ZIKV de tipo salvaje y combinar el ZIKV atenuado con uno o más excipientes farmacéuticos para suministrar dicha vacuna.

[0023] De acuerdo con otro aspecto, la presente divulgación suministra un método para fabricar una vacuna que comprende un ZIKV quimérico atenuado. La fabricación comprende combinar una porción de un genoma de ZIKV y una porción del genoma de la menos otro flavivirus, tal como, pero no limitado a, virus de dengue (por ejemplo, DEN1, DEN2, DEN3, o DEN4), virus del oeste del Nilo, virus de fiebre amarilla, virus de encefalitis Japonesa, virus de encefalitis transmitida por garrapatas, o combinaciones de los mismos, para suministrar el ZIKV quimérico atenuado, y combinar el ZIKV quimérico atenuado con uno o más excipientes farmacéuticos para suministrar dicha vacuna.

[0024] De acuerdo con un aspecto adicional, la presente divulgación suministra una composición inmunogénica pentavalente. La composición comprende: un primer virus atenuado que es inmunogénico contra el dengue de serotipo 1, un segundo virus atenuado que es inmunogénico contra el dengue de serotipo 2, un tercer virus atenuado que es inmunogénico contra el dengue de serotipo 3, un cuarto virus atenuado que es inmunogénico contra el dengue de serotipo 4, y un quinto virus atenuado que es inmunogénico contra ZIKV. En una modalidad particular, el quinto virus atenuado es una quimera de ácido nucleico de Zika de acuerdo con la presente divulgación. En otra modalidad particular, el quinto virus atenuado es un ZIKV que comprende una o más mutaciones de atenuación en el genoma.

[0025] De acuerdo con un aspecto de la invención, la presente divulgación suministra una composición inmunogénica multivalente. La composición comprende: uno o más primeros virus de atenuación que son inmunogénicos contra un flavivirus, y un segundo virus atenuado que es inmunogénico contra ZIKV. En

una modalidad particular, el uno o más primer virus atenuado es inmunogénico contra el virus del dengue (por ejemplo, serotipo 1, 2, 3, 4, o una combinación de los mismos), virus del oeste del Nilo, virus de fiebre amarilla, virus de encefalitis Japonesa, virus de encefalitis transmitida por garrapatas. En otra modalidad, el
5 segundo virus atenuado es una quimera de ácido nucleico de Zika de acuerdo con la presente divulgación. En otra modalidad particular, el segundo virus atenuado es un ZIKV que comprende una o más mutaciones de atenuación y/o eliminaciones en el genoma.

[0026] De acuerdo con un aspecto adicional, la presente divulgación suministra un
10 método para inducir una respuesta inmune contra ZIKV. El método comprende administrar una dosis farmacéuticamente aceptable de vacuna de ZIKV que comprende un ZIKV atenuado, en donde dicha atenuación es el resultado del genoma del ZIKV que comprende una o más mutaciones y/o eliminaciones de atenuación.

15 [0027] De acuerdo con un aspecto adicional, la presente divulgación suministra un método para inducir una respuesta inmune contra ZIKV. El método comprende administrar una dosis farmacéuticamente aceptable de una vacuna de ZIKV que comprende un ZIKV quimérico atenuado que tiene un genoma que comprende una porción de un genoma de ZIK y una porción del genoma de al menos otro flavivirus,
20 tal como, pero no limitado a, virus de dengue (por ejemplo, DEN1, DEN2, DEN3, o DEN4), virus del oeste del Nilo, virus de fiebre amarilla, virus de encefalitis Japonesa, virus de encefalitis transmitida por garrapatas, o combinaciones de los mismos.

[0028] De acuerdo con un aspecto, la presente divulgación suministra un método
25 para inducir una respuesta inmune contra ZIKV. El método comprende administrar una dosis farmacéuticamente aceptable de la composición inmunogénica pentavalente descrita acá.

[0029] De acuerdo con un aspecto adicional, la presente divulgación suministra un método para inducir una respuesta inmune contra ZIKV. El método comprende administrar una dosis farmacéuticamente aceptable de la composición inmunogénica multivalente descrita acá.

5 [0030] En varias modalidades, las mutaciones de atenuación pueden ser introducidas en uno o más de los genes que codifican las tres principales proteínas estructurales virales (proteínas cápside (C), premembrana/membrana (prM) y envoltente (E)) o en los genes que codifican las al menos siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5).

10 [0031] En otras modalidades, las mutaciones y/o eliminaciones de atenuación pueden ser introducidas en el 5' UTR.

[0032] En aún otras modalidades, las mutaciones y/o eliminaciones de atenuación pueden ser introducidas en el 3' UTR.

[0033] En modalidades adicionales, las mutaciones y/o eliminaciones de atenuación
15 pueden ser introducidas en cualquiera de los genes no estructurales, genes estructurales, el 5' UTR, o el 3' UTR, o combinaciones de los mismos.

[0034] En varias modalidades, se suministra flavivirus quiméricos que son atenuados e inmunogénicos. También se suministran virus Zika atenuados. En ciertas modalidades, los virus de Zika quiméricos contienen uno o más genes de
20 proteína no estructural (por ejemplo, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) de un virus de dengue como núcleo, el cual se combina con uno o más genes de proteína estructural de un ZIKV (por ejemplo, genes de proteína cápside (C), premembrana/membrana (prM) y envoltente (E)). Estos virus quiméricos exhiben inmunogenicidad pronunciada en la ausencia de los síntomas clínicos adjuntos de
25 la enfermedad viral. Los virus quiméricos atenuados son efectivos como inmunógenos o vacunas y se pueden combinar en una composición farmacéutica para conferir inmunidad contra ZIKV.

[0035] De acuerdo con un aspecto, la presente divulgación suministra una quimera de ácido nucleico de Zika que comprende una primera secuencia de nucleótido que codifica por lo menos una proteína estructural de un ZIKV, una segunda secuencia de nucleótido que codifica por lo menos una proteína no estructural (por ejemplo, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) de un primer flavivirus, y una tercera secuencia de nucleótido de una región 3' sin trasladar de un segundo flavivirus. En una modalidad, el primer flavivirus es un virus de dengue. En otra modalidad, el primer flavivirus es un ZIKV. En otra modalidad, el segundo flavivirus es un virus de dengue. En una modalidad adicional, el segundo flavivirus es un ZIKV. En una modalidad particular, el dengue de virus es un virus de dengue serotipo 1, serotipo 2, serotipo 3, o serotipo 4. En ciertas modalidades, la proteína estructural es pre-membrana (prM9, envoltente (E), o ambas.

[0036] En ciertas modalidades, cada uno de los virus atenuados incluye la misma eliminación y/o mutación de atenuación. En otras modalidades, la región 3' sin trasladar contiene una o más eliminaciones en la secuencia de nucleótido. Por ejemplo, la eliminación puede seleccionarse del grupo que consiste de: una eliminación $\Delta 30$, una eliminación $\Delta 31$, una eliminación $\Delta 30/31$, y una eliminación $\Delta 86$. En ciertas modalidades, la eliminación está acompañada por una mutación de atenuación adicional, por ejemplo, en un nucleótido que es o corresponde a la posición 4891 del gen NS3 del genoma DEN4 y/o una mutación en un nucleótido que es o corresponde con la posición 4995 del gen NS3 del genoma DEN4.

[0037] Donde sea aplicable o no se defina específicamente, cualquiera de las modalidades descritas acá se contempla para poderse combinar con cualquier otra o más modalidades, aunque las modalidades sean descritas bajo diferentes aspectos de la invención.

[0038] Estas y otras modalidades se divulgan o se contemplan variaciones abarcadas por la siguiente Descripción Detallada.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

[0039] Las características anteriores y otras características de la presente invención ahora se describirán en detalle con referencia a ciertas modalidades ejemplares de las mismas ilustradas en las figuras adjuntas las cuales están suministradas acá a
5 continuación a modo de ilustración únicamente, y por lo tanto, no son limitativas de la presente invención, y en donde:

[0040] La Figura 1A es la traslación y el procesamiento de la poliproteína de flavivirus. En la parte superior se ilustra el genoma viral con las regiones de codificación de proteína estructural y no estructural, la tapa 5', y las regiones sin
10 trasladar 5' y 3' (UTR) indicadas. Las cajas debajo del genoma indican los precursores y las proteínas maduras generadas por la cascada de procesamiento proteolítico. Las proteínas estructurales maduras se indican por cajas sombreadas y las proteínas no estructurales y los precursores de proteína estructural por cajas abiertas. Los tramos contiguos de los aminoácidos sin cargar se muestran por
15 barras negras. Los asteriscos denotan proteínas con glucanos de enlace N pero no necesariamente indican la posición o el número de sitios utilizados. Se indican los sitios de escisión para señales huésped (♦), la proteasa de serina viral (♥), furina u otra proteasa localizada Golgi (♥), o proteasas desconocidas (?). Tomado de Virología de Campo, 2001 Cuarta Edición, B. D. Lindenbach y C. M. Rice, página
20 998, Capítulo 32.

[0041] La Figura 1B muestra una estrategia usada para reemplazar los genes para las proteínas prM y E de DEN2 con los correspondientes genes de ZIKV para producir quimeras de Zika/DEN2 que sirven como candidatos de cepas de vacuna atenuada.

25 [0042] La Figura 1C muestra una estrategia usada para reemplazar los genes para las proteínas prM y E de DEN4 con los correspondientes genes de ZIKV para producir quimeras de Zika/DEN4 que sirven como candidatos de cepas de vacuna atenuada.

[0043] Figura 2A. Estructura secundaria predicha de la región TL-1, TL-2 y TL-3 del 3'-UTR de virus de serotipo DEN1. Se indica el número de acceso GenBank de la secuencia usada para la construcción del modelo de estructura secundaria. Sólo los últimos 278 nucleótidos que comprenden TL-1, TL-2 y TL-3, son utilizados para evitar la circularización de la estructura y el mal plegado posterior de los elementos estructurales conocidos y verificados experimentalmente. Se indican las restricciones del programa mfold específicas para cada modelo de estructura. Los nucleótidos que bordean las eliminaciones principales se encierran y se enumeran, con la numeración de nucleótido empezando en el extremo de genoma 3' (sistema de numeración de dirección inversa) (SEQ ID NO: 10).

[0044] Figura 2B. Mutación de eliminación $\Delta 30$ ilustrada para DEN1. La mutación $\Delta 30$ elimina nt 174 a 145 de DEN1, con sistema de numeración de dirección inversa. La región eliminada está indicada por el símbolo Δ (SEQ ID NO: 11).

[0045] Figura 2C. Mutación de eliminación $\Delta 30/31$ ilustrada para DEN1. Adicional a la eliminación de los nucleótidos que comprenden la mutación $\Delta 30$, la mutación $\Delta 31$ elimina nt 258 a 228 de DEN1 con sistema de numeración de dirección inversa. La región eliminada está indicada por el símbolo Δ (SEQ ID NO: 12).

[0046] Figura 2C. Mutación de eliminación $\Delta 86$ ilustrada para DEN1. La mutación $\Delta 86$ elimina nt 228 a 145 de DEN1 con sistema de numeración de dirección inversa. La región eliminada es indicada por el símbolo Δ (SEQ ID NO: 13).

[0047] Figura 3A. Estructura secundaria predicha de la región TL-1, TL-2 y TL-3 del 3'-UTR del virus de serotipo DEN2. Se indica el número de acceso de GenBank de la secuencia usada para la construcción del modelo de estructura secundario. Sólo los últimos 281 nucleótidos que comprenden TL-1, TL-2 y TL-3, son usados para evitar la circularización de la estructura y el posterior mal plegado de los elementos estructurales conocidos y verificados experimentalmente. Se indican las restricciones del programa mfold específicas para cada modelo de estructura. Los nucleótidos que bordean las eliminaciones principales se encierran y se enumeran,

con la numeración de nucleótido empezando en el extremo del genoma 3' (sistema de numeración de dirección inversa) (SEQ ID NO: 14).

[0048] Figura 3B. Mutación de eliminación $\Delta 30$ ilustrada para DEN2. La mutación $\Delta 30$ elimina nt 173 a 144 de DEN2, con sistema de numeración de dirección inversa.

5 La región eliminada es indicada por el símbolo Δ (SEQ ID NO: 15).

[0049] Figura 3C. Mutación de eliminación $\Delta 30/31$ ilustrada para DEN2. Adicional a la eliminación de los nucleótidos que comprenden la mutación $\Delta 30$, la mutación $\Delta 31$ elimina nt 258 a 228 de DEN2 con sistema de numeración de dirección inversa. La región eliminada es indicada por el símbolo Δ (SEQ ID NO: 16)

10 [0050] Figura 3D. Mutación de eliminación $\Delta 86$ ilustrada para DEN2. La mutación $\Delta 86$ elimina nt 228 a 144 de DEN2 con sistema de numeración de dirección inversa. La región eliminada es indicada por el símbolo Δ (SEQ ID NO: 17).

[0051] Figura 4A. Estructura secundaria predicha de la región TL-1, TL-2 y TL-3 del 3'-UTR del virus de serotipo DEN3. Se indica el número de acceso de GenBank de

15 la secuencia usada para la construcción del modelo de estructura secundario. Sólo los últimos 276 nucleótidos que comprenden TL-1, TL-2 y TL-3, son usados para evitar la circularización de la estructura y el posterior mal plegado de los elementos estructurales conocidos y verificados experimentalmente. Se indican las restricciones del programa mfold específicas para cada modelo de estructura. Los
20 nucleótidos que bordean las eliminaciones principales se encierran y se enumeran, con la numeración de nucleótido empezando en el extremo del genoma 3' (sistema de numeración de dirección inversa) (SEQ ID NO: 18).

[0052] Figura 4B. Mutación de eliminación $\Delta 30$ ilustrada para DEN3. La mutación $\Delta 30$ elimina nt 173 a 143 de DEN3, con sistema de numeración de dirección inversa.

25 La región eliminada es indicada por el símbolo Δ (SEQ ID NO: 19).

[0053] Figura 4C. Mutación de eliminación $\Delta 30/31$ ilustrada para DEN3. Adicional a la eliminación de los nucleótidos que comprenden la mutación $\Delta 30$, la mutación $\Delta 31$

elimina nt 258 a 228 de DEN3 con sistema de numeración de dirección inversa. La región eliminada es indicada por el símbolo Δ (SEQ ID NO: 20)

[0054] Figura 4D. Mutación de eliminación $\Delta 86$ ilustrada para DEN3. La mutación $\Delta 86$ elimina nt 228 a 143 de DEN3, con sistema de numeración de dirección inversa.

5 La región eliminada es indicada por el símbolo Δ (SEQ ID NO: 21).

[0055] Figura 5A. Estructura secundaria predicha de la región TL-1, TL-2 y TL-3 del 3'-UTR del virus de serotipo DEN4. Se indica el número de acceso de GenBank de la secuencia usada para la construcción del modelo de estructura secundario. Sólo los últimos 281 nucleótidos que comprenden TL-1, TL-2 y TL-3, son usados para

10 evitar la circularización de la estructura y el posterior mal plegado de los elementos estructurales conocidos y verificados experimentalmente. Se indican las restricciones del programa mfold específicas para cada modelo de estructura. Los nucleótidos que bordean las eliminaciones principales se encierran y se enumeran, con la numeración de nucleótido empezando en el extremo del genoma 3' (sistema
15 de numeración de dirección inversa) (SEQ ID NO: 22).

[0056] Figura 5B. Mutación de eliminación $\Delta 30$ ilustrada para DEN4. La mutación $\Delta 30$ elimina nt 172 a 143 de DEN4, con sistema de numeración de dirección inversa. La región eliminada es indicada por el símbolo Δ (SEQ ID NO: 23).

[0057] Figura 5C. Mutación de eliminación $\Delta 30/31$ ilustrada para DEN4. Adicional a
20 la eliminación de los nucleótidos que comprenden la mutación $\Delta 30$, la mutación $\Delta 31$ elimina nt 258 a 228 de DEN4 con sistema de numeración de dirección inversa. La región eliminada es indicada por el símbolo Δ (SEQ ID NO: 24)

[0058] Figura 5D. Mutación de eliminación $\Delta 86$ ilustrada para DEN4. La mutación $\Delta 86$ elimina nt 228 a 143 de DEN4, con sistema de numeración de dirección inversa.

25 La región eliminada es indicada por el símbolo Δ (SEQ ID NO: 25).

[0059] Figura 6. La vacuna de virus de dengue tetravalente atenuada viva contiene virus de dengue que representa cada uno de los 4 serotipos, con cada serotipo que contiene su conjunto completo de proteínas estructurales y no estructurales tipo

salvaje sin alterar y una mutación de atenuación $\Delta 30$ compartida. La ubicación relativa de las mutaciones $\Delta 30$ en la región sin trasladar 3' (UTR) de cada componente se indica por una flecha. En ciertos aspectos o modalidades como se describe acá, la vacuna de virus pentavalente atenuada comprende la vacuna de virus de dengue tetravalente atenuada viva combinada con un virus atenuado que es inmunogénico contra ZIKV (no mostrado).

[0060] Figura 7A. Alineación de secuencia de nucleótido de la región TL2 de DEN1, DEN2, DEN3, y DEN4 y sus derivados $\Delta 30$. También se muestra la correspondiente región para cada uno de los cuatro serotipos DEN. Las letras en mayúscula indican la homología de secuencia entre todos los 4 serotipos, el subrayado indica el emparejamiento de nucleótido para formar la estructura de tronco.

[0061] Figura 7B. Estructura secundaria predica de la región TL2 de cada serotipo DEN. Los nucleótidos que son removidos por las mutaciones $\Delta 30$ están en caja (DEN1 – entre los nucleótidos 10562-10591, DEN2 Tonga/74 – entre los nucleótidos 10541-10570, DEN3 Sleman/78 – entre los nucleótidos 10535-10565, y DEN4 – entre los nucleótidos 10478-10607).

[0062] Figura 8A. Los virus de dengue quiméricos recombinantes fueron contruidos al introducir las regiones CME o ME de DEN2 (Tonga/74) en el fondo genético de DEN4. La ubicación relativa de la mutación $\Delta 30$ en el 3' UTR se indica por una flecha y se indican las uniones intertípicas 1, 2, y 3.

[0063] Figura 8B. Secuencia de nucleótido y aminoácido de las regiones de unión intertípica. Se indican los sitios de reconocimiento de enzima de restricción usados en el ensamble de cada cADN quimérico.

[0064] Figura 9A. Los virus de dengue quiméricos recombinantes fueron contruidos al introducir las regiones CME o ME de DEN3 (Tonga/74) en el fondo genético de DEN4. La ubicación relativa de la mutación $\Delta 30$ en el 3' UTR se indica por una flecha y se indican las uniones intertípicas 1, 2, y 3. Se indican los sitios de reconocimiento de enzima de restricción en el ensamble de cada cADN quimérico.

[0065] Figura 9B. Secuencia de nucleótido y aminoácido de las regiones de unión intertípica. Se indican los sitios de reconocimiento de enzima de restricción usados en el ensamble de cada cADN quimérico.

[0066] Figura 10A. Los virus de dengue quiméricos recombinantes fueron
5 construidos al introducir las regiones CME o ME de DEN1 (Puerto Rico/94) en el fondo genético de DEN4. La ubicación relativa de la mutación $\Delta 30$ en el 3' UTR se indica por una flecha y se indican las uniones intertípicas 1, 2, y 3. Se indican los sitios de reconocimiento de enzima de restricción en el ensamble de cada cADN quimérico.

10 [0067] Figura 10B. Secuencia de nucleótido y aminoácido de las regiones de unión intertípica. Se indican los sitios de reconocimiento de enzima de restricción usados en el ensamble de cada cADN quimérico.

[0068] Figura 11. Se muestra el plásmido de la quimera de Zika/DEN2 $\Delta 30$. Se debe
15 notar que cualquiera de los otros núcleos de virus de dengue descritos más adelante se puede sustituir para el núcleo DEN2 $\Delta 30$ de la Figura 11.

[0069] Figura 12. Vacuna DENV y ZIKV pentavalente. Los plásmidos cADN quiméricos ilustrados reemplazan las regiones de gen prM y E de DEN2 $\Delta 30$ o DEN4 $\Delta 30$ con aquellos derivados de ZIKV-Paraíba/2015 (Brasil). Para estabilidad en *E. coli*, el marco de lectura abierta viral se interrumpido para las secuencias
20 intrón. Para virus infecciosos de recuperación, se transfectaron células Vero con el plásmido cADN y la transcripción para crear el genoma de virus procede desde la secuencia promotora CMV y se termina por ribozima (RBZ) y las secuencias terminadoras (TERM). Las secuencias de intrón fueron removidas mediante el proceso de empalme de ARN normal.

25 [0070] Figuras 13A y 13B. Mapas de plásmido para bases de DENV-2 (Figura 13A) y DENV-4 (Figura 13B).

[0071] Figuras 14A, 14B, y 14C. Ilustran las ubicaciones de las inserciones de intrón. La secuencia de intrón estándar es la misma para construcción de cADN. ZV-D2

contiene una inserción simple en el codón de alanina 149 en la región de gen NS1 (Figura 14A). ZV-D4 contiene dos inserciones de intrón ubicadas en el codón de alanina 148 en NS2A (Figura 14B) y el codón de alanina 425 de NS5 (Figura 14C). [0072] Figuras 15A y 15B. La cinética de crecimiento virus fue evaluada en dos multiplicidades diferentes de infección (MOI) para las quimeras DENV-ZIKV. Los virus quiméricos rZIKV/D2Δ30-710 (base DEN2Δ30) y rZIKV/D4Δ30-713 (base DEN4Δ30) fueron recuperados en células Vero, clonadas biológicamente por dos rondas de dilución terminal en células Vero y luego se amplificaron más por pasado en células Vero para generar existencias de semilla de trabajo. Ambos virus quiméricos se replican a más de 6 log₁₀PFU/mL con títulos con picos a aproximadamente el día 5. Para ambos virus, un MOI de 0.01 suministró mayores rendimientos.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

[0073] Aunque las vacunas efectivas para otros flavivirus existen, tal como dengue, fiebre amarilla, encefalitis Japonesa, una vacuna efectiva contra ZIKV aún no está disponible. Dado el estado actual del brote global, existe una necesidad inmediata en el estado del arte por desarrollar una vacuna efectiva anti-Zika. La presente divulgación aborda esta deficiencia en el arte al suministrar una vacuna contra ZIKV. La presente invención se basa, por lo menos en parte, en el descubrimiento que las composiciones y vacunas inmunogénicas y/o las composiciones y vacunas inmunogénicas multivalentes incluyendo, pero no limitado a, virus de dengue atenuado y genomas de ZIKV pueden generar respuestas inmunes y/o suministrar protección contra múltiples flavivirus (por ejemplo, dengue y Zika) en un sujeto. La divulgación describe varios aspectos que incluyen: virus de Zika atenuado novedosos; virus de Zika quimérico atenuado novedoso; genomas de ZIKV que comprenden una o más mutaciones y/o eliminaciones de atenuación; genomas de ZIKV quimérico; composiciones inmunogénicas efectivas para inducir inmunidad

contra ZIKV; vacunas anti-Zika que comprenden virus de Zika atenuado vivo; métodos para vacunar sujetos con una vacuna anti-Zika para proteger contra infecciones de Zika; métodos para fabricar genomas de ZIKV atenuado o genomas de ZIKV quimérico; métodos para fabricar vacunas de ZIKV atenuado o vacunas de ZIKV quimérico atenuado; y kits farmacéuticos que comprenden vacunas de ZIKV atenuada o vacunas de ZIKC quimérico atenuado, o vacunas multivalentes (por ejemplo, pentavalente) que comprenden una o más vacunas de flavivirus (por ejemplo, una o más vacunas de virus de dengue) y una vacuna de Zika. Otros aspectos son incluidos y descritos acá.

10 [0074] ZIKV y los virus de dengue son patógenos de flavivirus transmitidos por mosquitos. El genoma de flavivirus contiene una región 5' sin trasladar (5' UTR), seguido por una región que codifica proteína cápside (C), seguido por una región que codifica proteína premembrana/membrana (prM), seguido por una región que codifica proteína de envoltura (E), seguido por la región que codifica las proteínas no estructurales (NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5) y finalmente una región 3' sin trasladar (3' UTR). Las proteínas estructurales virales son C, prM, y E, y las proteínas no estructurales son NS1-NS5. Las proteínas estructurales y no estructurales se traducen como una poliproteína simple y se procesan por proteasas celulares y virales.

20 [0075] En ciertos aspectos, la presente divulgación se relaciona con una quimera de ácido nucleico que comprende una primera secuencia de nucleótido que codifica por lo menos una proteína estructural de un ZIKV, una segunda secuencia de nucleótido que codifica por lo menos una proteína no estructural de un primer flavivirus, y una tercera secuencia de nucleótido de una región 3' sin traducir de un
25 segundo flavivirus. La presente divulgación también se relaciona con una composición inmunogénica pentavalente que comprende: un primer virus atenuado que es inmunogénico contra dengue de serotipo 1, un segundo virus atenuado que es inmunogénico contra dengue de serotipo 2, un tercer virus atenuado que es

inmunogénico contra dengue de serotipo 3, un cuarto virus atenuado que es inmunogénico contra dengue de serotipo 4, y un quinto virus atenuado que es inmunogénico contra ZIKV. El quinto virus atenuado puede ser la quimera de ácido nucleico de acuerdo con la presente divulgación.

5 [0076] De acuerdo con un aspecto, la presente divulgación suministra un genoma de ZIKV modificado para contener una o más mutaciones de atenuación (tal como mutaciones, eliminaciones, inserciones, inversiones de punto, o combinaciones de los mismos) o un genoma de ZIKV quimérico que comprende una porción de un genoma de ZIKV y una porción del genoma de al menos otro flavivirus, tal como,
10 pero no limitado a, virus de dengue (por ejemplo, DEN1, DEN2, DEN3, o DEN4), virus del oeste de Nilo, virus de fiebre amarilla, virus de encefalitis Japonesa, virus de encefalitis transmitida por garrapatas, o combinaciones de los mismos.

[0077] De acuerdo con otro aspecto, la presente divulgación suministra un virión de ZIKV (es decir, partícula de virus) que comprende un genoma de ZIKV modificado
15 para contener una o más mutaciones de atenuación o un genoma de ZIKV quimérico que comprende una porción de un genoma de ZIKV y una porción del genoma de por lo menos otro flavivirus, tal como, pero no limitado a, virus de dengue (por ejemplo, DEN1, DEN2, DEN3, o DEN4), virus del oeste de Nilo, virus de fiebre amarilla, virus de encefalitis Japonesa, virus de encefalitis transmitida por
20 garrapatas, o combinaciones de los mismos.

[0078] De acuerdo con un aspecto, la presente divulgación suministra una composición inmunogénica o vacuna que comprende un ZIKV atenuado o un ZIKV atenuado. La atenuación del ZIKV atenuado puede ser el resultado del genoma del ZIKV que comprende una o más mutaciones y/o eliminaciones de atenuación. El
25 ZIKV quimérico tiene un genoma que comprende una porción de un genoma de ZIKV y una porción del genoma de por lo menos otro flavivirus, tal como, pero no limitado a, virus de dengue (por ejemplo, DEN1, DEN2, DEN3, o DEN4), virus del

oeste de Nilo, virus de fiebre amarilla, virus de encefalitis Japonesa, virus de encefalitis transmitida por garrapatas, o combinaciones de los mismos.

[0079] De acuerdo con otro aspecto, la presente divulgación suministra un kit farmacéutico que comprende una composición o vacuna inmunogénica. En una modalidad, la vacuna comprende un ZIKV atenuado, en donde la atenuación resulta del genoma del ZIKV que comprende una o más mutaciones y/o eliminaciones de atenuación, junto con un conjunto de instrucciones para utilizar la composición para vacunar un sujeto. En otra modalidad, la vacuna comprende un ZIKV quimérico atenuado que tiene un genoma que comprende una porción de un genoma de ZIKV y una porción del genoma de por lo menos otro flavivirus, tal como, pero no limitado a, virus de dengue (por ejemplo, DEN1, DEN2, DEN3, o DEN4), virus del oeste de Nilo, virus de fiebre amarilla, virus de encefalitis Japonesa, virus de encefalitis transmitida por garrapatas, o combinaciones de los mismos, junto con un conjunto de instrucciones para usar la composición para vacunar un sujeto.

[0080] De acuerdo con un aspecto, la presente divulgación suministra un método para vacunar un sujeto para suministrar inmunidad contra ZIKV. El método comprende administrar una dosis farmacéuticamente aceptable de una vacuna de ZIKV. La vacuna comprende bien sea un ZIKV atenuado o un ZIKV quimérico atenuado. La atenuación del ZIKV atenuado es el resultado del genoma del ZIKV que comprende una o más mutaciones y/o eliminaciones de atenuación. El ZIKV quimérico atenuado tiene un genoma que comprende una porción de un genoma de ZIKV y una porción del genoma de por lo menos otro flavivirus, tal como, pero no limitado a, virus de dengue (por ejemplo, DEN1, DEN2, DEN3, o DEN4), virus del oeste de Nilo, virus de fiebre amarilla, virus de encefalitis Japonesa, virus de encefalitis transmitida por garrapatas, o combinaciones de los mismos.

[0081] De acuerdo con un aspecto adicional, la presente divulgación suministra un método para fabricar una vacuna que comprende un ZIKV atenuado, en donde dicha atenuación es el resultado del genoma del ZIKV que comprende una o más

mutaciones y/o eliminaciones de atenuación. En una modalidad, el método para fabricar comprende introducir por lo menos una mutación y/o eliminación de atenuación en el genoma de un ZIKV de tipo salvaje y combinar el ZIKV atenuado con uno o más excipientes farmacéuticos para suministrar dicha vacuna.

5 [0082] De acuerdo con otro aspecto, la presente divulgación suministra un método para fabricar una vacuna que comprende un ZIKV quimérico atenuado. En una modalidad, la fabricación comprende combinar una porción de un genoma de ZIKV y una porción del genoma de por lo menos otro flavivirus, tal como, pero no limitado a, virus de dengue (por ejemplo, DEN1, DEN2, DEN3, o DEN4), virus del oeste de
10 Nilo, virus de fiebre amarilla, virus de encefalitis Japonesa, virus de encefalitis transmitida por garrapatas, o combinaciones de los mismos, para suministrar el ZIKV quimérico atenuado, y combinar el ZIKV quimérico atenuado con uno o más excipientes farmacéuticos para suministrar dicha vacuna.

[0083] De acuerdo con un aspecto de la invención, la presente divulgación
15 suministra una composición inmunogénica multivalente. La composición comprende: por lo menos un primer virus atenuado que es inmunogénico contra un flavivirus, y un segundo virus atenuado que es inmunogénico contra ZIKV. En una modalidad particular, el uno o más primer virus atenuado es inmunogénico contra el virus del dengue (por ejemplo, serotipo 1, 2, 3, 4, o una combinación de los mismos),
20 virus del oeste del Nilo, virus de fiebre amarilla, virus de encefalitis Japonesa, virus de encefalitis transmitida por garrapatas. En otra modalidad, el segundo virus atenuado es una quimera de ácido nucleico de Zika de acuerdo con la presente divulgación. En otra modalidad particular, el segundo virus atenuado es un ZIKV que comprende una o más mutaciones y/o eliminaciones de atenuación en el
25 genoma. En una modalidad particular, el por lo menos un primer virus atenuado incluye un primer virus atenuado que es inmunogénico contra el dengue de serotipo 1, un segundo virus atenuado que es inmunogénico contra el dengue de serotipo 2, un tercer virus atenuado que es inmunogénico contra el dengue de serotipo 3, y un

cuarto virus atenuado que es inmunogénico contra el dengue de serotipo 4, produciendo de esta forma una composición inmunogénica pentavalente.

[0084] De acuerdo con un aspecto adicional, la presente divulgación suministra un método para inducir una respuesta inmune contra ZIKV. El método comprende

5 administrar una dosis farmacéuticamente aceptable de una vacuna de ZIKV que comprende un ZIKV atenuado o un ZIKV quimérico atenuado. En una modalidad, la atenuación del ZIKV atenuado es el resultado del genoma del ZIKV que comprende una o más mutaciones y/o eliminaciones de atenuación. En otra modalidad, el ZIKV quimérico atenuado tiene un genoma que comprende una porción de un genoma de

10 ZIKV y una porción del genoma de por lo menos otro flavivirus, tal como, pero no limitado a, virus de dengue (por ejemplo, DEN1, DEN2, DEN3, o DEN4), virus del oeste de Nilo, virus de fiebre amarilla, virus de encefalitis Japonesa, virus de encefalitis transmitida por garrapatas, o combinaciones de los mismos.

[0085] De acuerdo con un aspecto, la presente divulgación suministra un método

15 para inducir una respuesta inmune contra ZIKV. El método comprende administrar una dosis farmacéuticamente aceptable de la composición inmunogénica pentavalente descrita acá o la composición inmunogénica multivalente descrita acá.

[0086] Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes, figura y otras referencias citadas o referenciadas acá y todos los documentos citados o

20 referenciados en los documentos acá citados, junto con las instrucciones del fabricante, descripciones, especificaciones de producto, y hojas de producto para cualquier producto mencionado acá o en cualquier documento incorporado por referencia acá, se incorporan acá por referencia, y pueden ser empleados en la práctica de la invención. Por ejemplo, la presente divulgación está relacionada con

25 las Publicaciones de Solicitud de Patente de EE.UU. 2009/0028900 A1, 2010/0316670 A1, 2005/0010043 A1, 2004/0033594 A1, 2005/0100886 A1, 2007/0134256, 2010/0104598 A1, 2007/0009552 A1, WO 2008/157136 A1, WO

2006/036233 A1, WO 03/092592 A1, WO 03/059384 A1, y WO 01/59093 A1, todas las cuales son incorporadas acá por referencia para todos los propósitos.

[0087] A menos que se defina lo contrario, los términos técnicos y científicos usados acá tienen el mismo significado como es comúnmente entendido por un experto en la materia al cual pertenezca esta invención. Ver, por ejemplo, Singleton P y Sainsbury D., Diccionario de Microbiología y Biología Molecular, 3ª Ed., J Wiley e Hijos, Chichester, Nueva York, 2001, y Virología de Campo 4ª Ed, Knipe D.M. y Howley P.M. eds, Lippincott Williams y Wilkins, Filadelfia 2001.

[0088] El término “aproximadamente” significa dentro de 1, 2, o 3 nucleótidos.

10 [0089] Los artículos “un” y “uno” como se usan acá y en las reivindicaciones adjuntas son usados acá para referirse a uno o más de uno (es decir, por lo menos uno) de los objetos gramaticales del artículo a menos que el contexto claramente indique lo contrario. A modo de ejemplo, “un elemento” significa un elemento o más de un elemento.

15 [0090] La frase “y/o”, como se usa acá en la descripción y en las reivindicaciones, se debe entender que significa “cualquiera o ambos” de los elementos así enlazados, es decir, los elementos que están conjuntivamente presentes en algunos casos y disyuntivamente presentes en otros casos. Múltiples elementos definidos con “y/o” se deben construir en la misma forma, es decir, “uno o más” de los
20 elementos definidos. Otros elementos pueden estar opcionalmente presentes diferentes a los elementos específicamente identificados por la cláusula “y/o”, bien sea relacionados o no relacionados con aquellos elementos específicamente identificados. Así, como un ejemplo no limitante, una referencia a “A y/o B”, cuando se usa en conjunto con lenguaje abierto tal como “que comprende” puede referirse,
25 en una modalidad, a A únicamente (opcionalmente incluyendo elementos diferentes a B); en otra modalidad, a B únicamente (opcionalmente incluyendo elementos diferentes a B); en otra modalidad, tanto a A como a B (opcionalmente incluyendo otros elementos), etc.

[0091] Como se usa acá en la descripción y en las reivindicaciones, “o” se debe entender que tiene el mismo significado que “y/o” como se definió anteriormente. Por ejemplo, cuando se separan artículos en una lista, “o” o “y/o” se deben interpretar como que son inclusivos, es decir, la inclusión de al menos uno, pero también incluyendo más de uno, de un número o lista de elementos, y, opcionalmente, artículos adicionales no enunciados. Sólo los términos que claramente indican lo contrario, tal como “sólo uno de” o “exactamente uno de”, o cuando se usa en las reivindicaciones “que consiste de”, se referirá a la inclusión de exactamente un elemento de un número o lista de elementos. En general, el término “o” como se usa acá sólo será interpretado como que indica alternativas exclusivas (es decir, “uno o el otro pero no ambos”) cuando es precedido por términos de exclusividad, tal como “alguno”, “uno de”, “sólo uno de”, o “exactamente uno de”.

[0092] En las reivindicaciones, así como en la descripción anterior, todas las frases transicionales tal como “que comprende”, “que incluye”, “que porta”, “que tiene”, “que involucra”, “que mantiene”, “compuesta de”, y similares se deben entender que son abiertas, es decir, que significan que incluyen pero no se limitan a. Únicamente las frases transicionales “que consiste de”, y “que consiste esencialmente de” deben ser frases transicionales cerradas o semi-cerradas, respectivamente, como se define en el Manual de la Oficina de Patentes de Estados Unidos para Procedimientos de Examen de Patente, Sección 2111.03.

[0093] Como se usa acá en la descripción y en las reivindicaciones, la frase “por lo menos uno” en referencia a una lista de uno o más elementos, se debe entender que significa por lo menos un elemento seleccionado de cualquier o más de los elementos en la lista de elementos, pero no necesariamente incluyendo al menos uno de cada elemento específicamente enunciado en la lista de elementos y no excluyendo ninguna combinación de elementos en la lista de elementos. Esta definición también permite que elementos puedan estar opcionalmente presentes diferentes a los elementos específicamente identificados en la lista de elementos a

la cual se refiere la frase “por lo menos uno”, bien sea relacionados o no relacionados con aquellos elementos específicamente identificados. Así, como un ejemplo no limitante, “por lo menos uno de A y B” (o, equivalentemente, “por lo menos uno de A o B”, o equivalentemente, “por lo menos uno de A y/o B”) puede referirse, en una modalidad, a por lo menos uno, opcionalmente incluyendo más de uno, A, sin B presente (y opcionalmente incluyendo elementos diferentes a B); en otra modalidad, a por lo menos uno, opcionalmente incluyendo más de uno, B, sin A presente (y opcionalmente incluyendo elementos diferentes de A); en otra modalidad, a por lo menos uno, opcionalmente incluyendo más de uno, A, y por lo menos uno, opcionalmente incluyendo más de uno, B (y opcionalmente incluyendo otros elementos); etc.

[0094] Se debe entender que, en ciertos métodos descritos acá que incluyen más de un paso o acto, el orden de los pasos o actos del método no está necesariamente limitado al orden en el cual los pasos o acciones del método están definidos a menos que el contexto indique lo contrario.

[0095] Los términos “co-administración” y “co-administrar” o “terapia de combinacion” se refieren a administración concurrente (administración de dos o más agentes terapéuticos al mismo tiempo) y administración variada de tiempo (administración de uno o más agentes terapéuticos a un tiempo diferente de la administración de un agente terapéutico adicional o agentes), siempre y cuando los agentes terapéuticos estén presentes en el paciente en alguna medida, preferiblemente en cantidades efectivas, al mismo tiempo. En ciertos aspectos preferidos, uno o más de los presentes compuestos descritos acá, son coadministrados en combinación con al menos un agente bioactivo adicional, especialmente que incluye un agente anticancerígeno. En aspectos particularmente preferidos, la coadministración de compuestos resulta en actividad y/o terapia sinérgica, incluyendo actividad anticancerígena.

[0096] El término “paciente” o “sujeto” es utilizado a lo largo de la descripción para describir un animal, preferiblemente un humano o un animal domesticado, al que se le suministra tratamiento, incluyendo tratamiento profiláctico, con las composiciones de acuerdo con la presente divulgación. Para el tratamiento de esas infecciones, condiciones o estados de enfermedad que son específicas para un animal específico tal como un paciente humano, el término paciente se refiere a ese animal específico, incluyendo un animal domesticado tal como un perro o gato o un animal de granja tal como un caballo, vaca, oveja, etc. En general, en la presente divulgación, el término paciente se refiere a un paciente humano a menos que se indique lo contrario o esté implícito a partir del contexto del uso del término.

[0097] El término “efectiva” como se usa acá para describir una cantidad de un compuesto, composición o componente el cual, cuando se usa dentro del contexto de su uso destinado, tiene un efecto de un resultado destinado. El termino efectivo subsume todas las otras cantidades efectivas o términos de concentración efectiva, los cuales de otra forma se describen o se usan en la presente solicitud.

[0098] El término “residuo” se usa acá para referirse a un aminoácido (D o L) o un mimético de aminoácido que es incorporado en un péptido por una unión amida. Como tal, el aminoácido puede ser un aminoácido que ocurre naturalmente o, a menos que se limite de forma contraria, puede abarcar análogos conocidos de aminoácidos naturales que funcionan en una forma similar a los aminoácidos que ocurren naturalmente (es decir, miméticos de aminoácido). Además, un mimético de unión amida incluye modificaciones en la columna de péptido bien conocidas para los expertos en la materia.

[0099] Adicionalmente, un experto en la materia reconocerá que las sustituciones, eliminaciones o adicionales individuales en la secuencia de aminoácido, o en la secuencia de nucleótido que codifica para los aminoácidos, que altera, adiciona o elimina un aminoácido simple o un porcentaje pequeño de aminoácidos (típicamente menos de 5%, más típicamente menos de 1%) en una secuencia codificada son

variaciones conservadoramente modificadas, en donde las alteraciones resultan en la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustitución conservadora que suministran aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Los siguientes seis grupos cada uno contiene aminoácidos que son sustituciones conservadoras entre sí: (1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T); (2) Ácido Aspártico (D), ácido glutámico (E); (3) Asparagina (N), Glutamina (Q); (4) Arginina (R), Lisina (K); (5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); y (6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W). Otros términos sin definidos o de otra forma descritos acá.

10 [0100] **Virus de Zika Atenuados Mutantes y Virus de Zika Atenuados Quiméricos**

[0101] La invención se relaciona con virus de Zika que son atenuados como resultado de (a) la introducción de una o más (por ejemplo, por lo menos 1, 2, 3, 4, o 5) mutaciones de atenuación en el genoma viral de Zika, o (b) que convierte un ZIKV en un virus quimérico al modificar un primer genoma de “núcleo” de flavivirus (por ejemplo, DEN1, DEN2, DEN3, o DEN4, virus de encefalitis transmitida por garrapata, o virus del oeste del Nilo) para incluir uno o más genes de ZIKV que codifican componentes inmunogénicos (por ejemplo, genes que codifican cápside de Zika o proteínas de pre-membrana o ambos).

20 [0102] En el caso de virus de Zika atenuados, las mutaciones de atenuación pueden incluir cualquier mutación, inserción, eliminación, o inversión de punto, o cualquier combinación de los mismos, o cualquiera de dichas mutaciones que reduce o elimina la virulencia del ZIKV, pero que no bloquea la capacidad del virus de replicar y de otra forma permitir que sus componentes inmunogénicos se expresen. Las mutaciones de atenuación se pueden introducir en cualquier parte en el genoma. Por ejemplo, las mutaciones se pueden introducir en uno o más genes no estructurales (genes NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5), uno o más genes

estructurales (genes cápside (C), premembrana/membrana (prM) y envoltente (E)), o el 5' UTR o el 3' UTR, o combinaciones de los mismos.

[0103] En el caso de virus de Zika quiméricos, la estructura del virus quimérico

puede variar considerablemente. En ciertas modalidades, un genoma de ZIKV (por

ejemplo, una cepa de tipo salvaje de ZIKV) se puede modificar al reemplazar o

sustituir uno o más componentes genéticos (por ejemplo, un gen no estructural, un

gen estructural, un 5' UTR o un 3' UTR) en el genoma de Zika con el mismo

componente genético de otros flavivirus (por ejemplo, de DEN1, DEN2, DEN3, o

DEN4). En esta modalidad, el ZIKV se puede considerar como un genoma base en

el cual ciertos componentes genéticos allí son reemplazados con los

correspondientes componentes genéticos de otro flavivirus para formar un virus

quimérico. Los virus quiméricos resultantes son atenuados. En ciertas modalidades,

el genoma de flavivirus diferente de Zika (por ejemplo, DEN1, DEN2, DEN3, o

DEN4) se puede modificar al reemplazar o sustituir uno o más componentes

genéticos (por ejemplo, un gen no estructural, un gen estructural, un 5' UTR o un 3'

UTR) en el genoma de flavivirus con el correspondiente componente genético de un

genoma de ZIKV. En esta modalidad, el genoma de flavivirus puede considerarse

como un genoma base en el cual ciertos componentes genéticos allí son

reemplazados con los correspondientes componentes genéticos de un ZIKV para

formar un virus quimérico. Los virus quiméricos resultantes son atenuados.

[0104] En una modalidad, la invención suministra un ZIKV quimérico construido a

partir de un núcleo de flavivirus en donde uno o más genes estructurales (flavivirus

C, prM, y/o E) allí han sido reemplazados con los correspondientes uno o más genes

estructurales de un ZIKV.

[0105] En otra modalidad, la invención suministra un ZIKV quimérico construido a

partir de un núcleo de virus de dengue (por ejemplo, DEN1, DEN2, DEN3, o DEN4,

o un quimérico del mismo) en donde uno o más genes estructurales (dengue C,

prM, y/o E) allí han sido reemplazados con los correspondientes uno o más genes estructurales de un ZIKV.

[0106] En otra modalidad, la invención suministra un ZIKV quimérico construido a partir de un núcleo de virus de dengue de serotipo 2, en donde uno o más genes
5 estructurales (dengue de serotipo 2 C, prM, y/o E) allí han sido reemplazados con los correspondientes uno o más genes estructurales de un ZIKV.

[0107] En otra modalidad, la invención suministra un ZIKV quimérico construido a partir de un núcleo de virus de dengue de serotipo 4, en donde uno o más genes estructurales (dengue de serotipo 4 C, prM, y/o E) allí han sido reemplazados con
10 los correspondientes uno o más genes estructurales de un ZIKV.

[0108] En otra modalidad, la invención suministra un ZIKV quimérico construido a partir de un núcleo de virus de dengue de serotipo 1, en donde uno o más genes estructurales (dengue de serotipo 1 C, prM, y/o E) allí han sido reemplazados con los correspondientes uno o más genes estructurales de un ZIKV.

15 [0109] En otra modalidad, la invención suministra un ZIKV quimérico construido a partir de un núcleo de virus de dengue de serotipo 3, en donde uno o más genes estructurales (dengue de serotipo 3 C, prM, y/o E) allí han sido reemplazados con los correspondientes uno o más genes estructurales de un ZIKV.

[0110] En cualquiera de las modalidades de ZIKV quimérico, el virus base usado
20 para formar el ZIKV quimérico (por ejemplo, un ZIKV en ciertas modalidades, y otro flavivirus en otras modalidades) puede comprender, adicionalmente, una o más mutaciones de atenuación como se describió anteriormente. Estas mutaciones de atenuación adicionales se pueden introducir en cualquier parte en el genoma base. Por ejemplo, las mutaciones se pueden introducir en uno o más genes no
25 estructurales (genes NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5), o uno o más genes estructurales (genes cápside (C), premembrana/membrana (prM) y envoltente (E)), o el 5' UTR o el 3' UTR, o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, un ZIKV quimérico que comprende una base DEN2 o una base DEN4 en

la cual uno o más genes de proteína estructural allí fueron sustituidos con los correspondientes genes de proteína estructural de Zika puede además comprender un $\Delta 30$, $\Delta 30/31$, o $\Delta 86$, o cualquier otra mutación de atenuación en el 3' UTR adicional a las mutaciones $\Delta 30$, $\Delta 30/31$, o $\Delta 86$

5 [0111] Acá se suministran quimeras de Zika inmunogénica y métodos para preparar las quimeras de Zika. Las quimeras de ZIKV inmunogénicas son útiles, solas o en combinación, en un portador farmacéuticamente aceptable como composiciones inmunogénicas para inmunizar y proteger individuos y animales contra infección por ZIKV. En ciertas modalidades, la quimera de Zika debe inducir una respuesta
10 humoral (anticuerpo) a ZIKV, mientras que las proteínas no estructurales del virus de dengue deben incluir una respuesta de célula T.

[0112] Las quimeras de Zika de la presente divulgación pueden comprender secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas estructurales inmunogénicas de un ZIKV y secuencias de nucleótido adicionales seleccionadas de la base de un
15 virus de dengue. Las quimeras de Zika de la presente divulgación pueden comprender secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas estructurales inmunogénicas y las proteínas no estructurales de ZIKV y el 3' UTR de un virus de dengue (por ejemplo, serotipo 1, serotipo 2, serotipo 3, o serotipo 4). En una modalidad, el 3' UTR del virus de dengue contiene una eliminación de atenuación.
20 La presente divulgación también contempla un ZIKV atenuado que incluye una eliminación o mutación de atenuación, como se describió anteriormente con relación a la atenuación del virus de dengue. Los virus quiméricos de Zika derivados de las secuencias de nucleótidos pueden ser utilizados para inducir una respuesta inmunogénica contra ZIKV.

25 [0113] En otra modalidad, la quimera preferida es una quimera de ácido nucleico de Zika que comprende una primera secuencia de nucleótido que codifica por lo menos una proteína estructural de un ZIKV, y una segunda secuencia de nucleótido que codifica proteínas no estructurales de un virus de dengue. En otra modalidad, el

virus de dengue es atenuado. En otra modalidad, el virus de dengue es DEN2. En otra modalidad, el virus de dengue es DEN4. En otra modalidad, el virus de dengue es DEN3. En una modalidad adicional, el virus de dengue es DEN1. En modalidades particulares, la proteína estructural puede ser la proteína C de un ZIKV, la proteína prM de un ZIKV, la proteína E de un ZIKV, o cualquier combinación de los mismos.

[0114] Como se usa acá, los términos “quimera de Zika”, “virus quimérico de Zika” y “ZIKV quimérico” significan una construcción infecciosa de la invención que comprende secuencias de nucleótido que codifican la inmunogenicidad de un ZIKV y secuencias de nucleótido adicionales derivadas del núcleo de un flavivirus, tal como, pero no limitado a, virus de dengue, o un ZIKV atenuado.

[0115] Como se usa acá, “construcción infecciosa” indica un virus, una construcción viral, una quimera viral, un ácido nucleico derivado de un virus o cualquier porción del mismo, el cual puede ser usado para infectar una célula.

[0116] Como se usa acá, “quimera de ácido nucleico de Zika” significa una construcción como se describe acá que comprende ácido nucleico que comprende secuencias de nucleótido que codifican la inmunogenicidad de un ZIKV y secuencias de nucleótido adicionales derivadas de la base de un flavivirus, tal como, pero no limitado a, virus de dengue o un ZIKV atenuado. De forma correspondiente, cualquier flavivirus quimérico o quimera de flavivirus como se describe acá se debe reconocer como un ejemplo de una quimera de ácido nucleico.

[0117] Como se usa acá, “proteínas estructurales y no estructurales” puede significar o incluir cualquier proteína que comprende o cualquier gen que codifica la secuencia de la proteína completa, un epítipo de la proteína, o cualquier fragmento que comprende, por ejemplo, tres o más residuos de aminoácido del mismo.

[0118] Las quimeras de flavivirus de la invención son construcciones formadas al fusionar genes de proteína estructural de un ZIKV con genes de proteína no estructural de un flavivirus, tal como, pero no limitado a, virus de dengue, por

ejemplo, DEN1, DEN2, DEN3, o DEN4. Se contempla el uso de cualquier cepa, tal como aquellas cepas de dengue de la Tabla 1.

Tabla 1. Ejemplos de Cepas de Virus de Dengue y sus Número de Acceso Asociados

Serotipo	Cepa	No. de Acceso
1	02-20	AB178040
1	16007	AF180817
1	16007 PDK-13	AF180818
1	259par00	AF514883
1	280par00	AF514878
1	293arg00	AY206457
1	295arg00	AF514885
1	297arg00	AF514889
1	301arg00	AF514876
1	98901518	AB189120
1	98901530	AB189121
1	A88	AB074761
1	Abidjan	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

5

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
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	rWestern Pacific-delta30	AY145123
1	Pacifico Occidental rDEN1 mutF	AY145122
1	S275-90	A75711
1	D1-hu-Seychelles-NIID41-2003	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	AY732474
1	Pacifico Occidental Recombinante	AY145121
1	Pacifico Occidental de Isla Nauru 45AZ5	NC_001477
1	Isla Nauru, Bethesda de Pacifico Occidental	U88535
1	Pacifico Occidental de Isla Nauru 45AZ5-PDK27	U88537
2	131	AF100469

2	131	AF100469
2	16681-PDK53	M84728
2	16681 Blok	M84727
2	16681 Kinney	U87411
2	43	AF204178
2	44	AF204177
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	AB122021
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	AF100459
2	K0010	AF100460
2	Mara4	AF100466
2	DEN2-H-IMTSSA-MART-98-703	AF208496

2	Nueva Guinea C	AF038403
2	Nueva Guinea C-PUO-281 híbrido	AF038402
2	Nueva Guinea C	M29095
2	PDK-53	U87412
2	S1 vacuna	NC_001474
2	TB16i	AY858036
2	ThD2_0017_98	DQ181799
2	ThD2_0026_88	DQ181802
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	Taiwan-1008DHF	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	A6189127
3	98902890	AB189128
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	BDH02_01 mutante	DQ401689
3	BDH02_03 mutante	DQ401691
3	BDH02_04 mutante	DQ401692
3	BDH02_07 mutante	DQ401693
3	InJ_16_82 mutante	DQ401694
3	PbMH_J1_97 mutante	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
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	Taiwan-739079A	AY776329
4	2A	AF375822
4	Clon recombinante rDEN4	AF326825
4	2AdeI30	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	Taiwan-2K0713	AY776330
4	Desconocido	M14931

[0119] Las quimeras de flavivirus inmunogénicas atenuadas provistas acá contienen uno o más de los genes de proteína estructural, o porciones antigénicas de los mismos, del ZIKV contra los cuales se confiere inmunogenicidad, y los genes de proteína no estructural de otros flavivirus, por ejemplo, un virus de dengue.

[0120] En ciertos aspectos, la quimera como se describe acá contiene un genoma de virus de dengue como la base, en la cual los genes de proteína estructural que codifican la proteína C, prM, o E del genoma de dengue, o combinaciones de las mismas, son reemplazados con los correspondientes genes de proteína estructural de un ZIKV contra el que se debe proteger. El virus quimérico resultante tiene las propiedades, por virtud de ser quimerizado con el virus de dengue, de atenuación y por lo tanto se reduce en virulencia, pero expresa epítopos antigénicos de los productos de gen estructural de ZIKV y, por lo tanto, es inmunogénico.

[0121] Se puede utilizar el genoma de cualquier flavivirus como la base en las quimeras atenuadas descritas acá. La base puede contener mutaciones que contribuyen al fenotipo de atenuación del flavivirus o que facilitan la replicación en el sustrato celular usado para la fabricación, por ejemplo, células Vero. Las mutaciones pueden estar en la secuencia de nucleótido que codifica proteínas no estructurales, la región 5' sin traducir o la región 3' sin traducir. La base también puede contener mutaciones adicionales para mantener la estabilidad del fenotipo de atenuación y para reducir la posibilidad que el virus atenuado o la quimera pueda devolverse al virus de tipo salvaje virulento.

[0122] En ciertas modalidades, el genoma de cualquier virus de dengue puede ser usado como la base en las quimeras atenuadas descritas acá. La base puede

contener mutaciones que contribuyen al fenotipo de atenuación del virus de dengue o que facilitan la replicación en el sustrato celular usado para la fabricación, por ejemplo, células Vero. Las mutaciones pueden estar en la secuencia de nucleótido que codifica las proteínas no estructurales, la región 5' sin traducir o la región 3' sin traducir. La base también puede contener mutaciones adicionales para mantener la estabilidad del fenotipo de atenuación y para reducir la posibilidad que el virus atenuado o la quimera puedan devolverse al virus de tipo salvaje virulento.

[0123] Con relación a las Figuras 2A, 3A, 4A, y 5A, usando un acercamiento, el 3'-UTR del virus de dengue contiene varios motivos de secuencia conservados. Las ubicaciones de varios componentes de secuencia en esta región son designadas con el sistema de numeración de dirección inversa. Estas secuencias incluyen la estructural secundaria distal 3' (por ejemplo, los nucleótidos 1-93 en DEN4), predichas para formar el ciclo de tallo 1 (SL-1=, la cual contiene el ciclo terminal 1 (TL-1). Los nucleótidos 117-183 en DEN4 forman el ciclo de paso (SL-2) el cual contiene TL-2. Los nucleótidos 201-227 en DEN4 forman un par de ciclos de tallo (SL-3) los cuales en parte contienen TL-3. Aunque los nucleótidos que están en el espacio entre SL-2 y circundantes a SL-1 y SL-3 difieren entre los serotipos de virus de dengue, la estructura general de SL-2 es bien conservada. Adicionalmente, los 9 nucleótidos expuestos que comprenden TL-2 son idénticos dentro de todos los 4 serotipos de dengue. Esto es TL-2 y su estructura de soporte que son removidos por una mutación $\Delta 30$ (por ejemplo, alrededor de los nucleótidos 143-172 en DEN4). La remoción de estos 30 nucleótidos resulta en la formación de un nuevo elemento estructural predico (SL-2 $\Delta 30$) el cual tiene una secuencia principal y una estructura secundaria la cual es idéntica para cada uno de los serotipos de virus de dengue.

[0124] En particular, una mutación que es una eliminación de 30 (" $\Delta 30$ ") nucleótidos de la región 3' sin traducir del genoma DEN4 entre los nucleótidos 10478-10507 resulta en la atenuación del virus DEN4. Por lo tanto, el genoma de cualquier virus de dengue tipo 4 que contiene dicha mutación en su ubicación puede ser usado

como la base en las quimeras atenuadas descritas acá. Además, otros genomas de virus de dengue que contienen una mutación de eliminación análoga en la región 3' sin traducir de los genomas de otros serotipos de virus de dengue también pueden ser usados como la estructura base de la quimera de la presente divulgación. Por ejemplo, una mutación en este locus puede ser usada en el genoma del tipo 1 de dengue (eliminación de 30 nucleótidos entre 10562-10591 de DEN1; DEN1 Δ 30), tipo 2 de dengue (eliminación de 30 nucleótidos entre 10541-10570 de DEN2 Tonga/74; DEN2 Δ 30), tipo 3 de dengue (eliminación de 30 nucleótidos entre 10535-10565 de DEN3 Sleman/78; DEN3 Δ 30), y/o tipo 4 de dengue (eliminación de 30 nucleótidos entre 10478-10507 de DEN4; DEN4 Δ 30) como una estructura base de la quimera de la presente divulgación. La eliminación Δ 30 remueve la estructura homóloga TL-2 y la secuencia hasta la estructura homóloga TL-3 y se puede ver en las Figuras 2B, 3B, 4B, y 5B.

[0125] En otra modalidad, una mutación que es una eliminación de 31 (" Δ 31") nucleótidos del TL-3 del genoma de dengue atenúa la estructura base de la quimera de la presente invención. Las Figuras 2C, 3C, 4C, y 5C ilustran las eliminaciones Δ 31 en DEN1, DEN2, DEN3, y DEN4, respectivamente. Por lo tanto, el genoma de cualquier virus de dengue tipo 2 que contiene dicha mutación en este locus puede ser usado como la base en las quimeras atenuadas descritas acá- además, otros genomas de virus de dengue que contienen una mutación de eliminación análoga en el TL-3 de los genomas de otros serotipos de virus de dengue también pueden ser utilizados como la estructura base de la quimera de la presente divulgación.

[0126] En algunas modalidades, la estructura principal del dengue de la quimera de Zika de la presente divulgación incluye las mutaciones Δ 30 y Δ 31 (es decir, DEN1 Δ 30/31, DEN2 Δ 30/31, DEN3 Δ 30/31, y/o DEN4 Δ 30/31).

[0127] En otra modalidad, una mutación que es una eliminación de 86 (" Δ 86") nucleótidos remueve la estructura homóloga TL-2 y la secuencia hasta la estructura homóloga TL-3 de un virus de dengue (por ejemplo, DEN1, DEN2, DEN3, y/o

DEN4). Por lo tanto, el genoma de cualquier virus de dengue de tipo 1, 2, 3, y/o 4 que contiene dicha mutación en este locus puede ser usado como la base en las quimeras atenuadas descritas acá. Las Figuras 2D, 3D, 4D, y 5D ilustran las eliminaciones $\Delta 86$ en DEN1, DEN2, DEN3, y DEN4, respectivamente.

5 [0128] En una modalidad particular, la quimera de Zika incluye el DEN2 $\Delta 30$ como la estructura principal de la quimera. En otra modalidad, la quimera de Zika incluye el DEN4 $\Delta 30$ como la estructura principal de la quimera. En otras modalidades, la quimera de Zika incluye el DEN3 $\Delta 30/31$ como la estructura principal de la quimera.

[0129] En varias modalidades, las quimeras de Zika de la invención pueden incluir
10 mutaciones y/o eliminaciones en el UTR 3' y/o UTR 5' que son adicionales a las eliminaciones $\Delta 30$, $\Delta 31$, y $\Delta 86$, incluyendo las descritas en la Solicitud PCT No. PCT/US2007/076004 (DESARROLLO DE COMPONENTES DE VACUNA DE VIRUS DE DENGUE), la cual se incorpora acá por referencia.

[0130] Las mutaciones descritas anteriormente se pueden lograr por mutagénesis
15 dirigida al sitio usando técnicas conocidas para los expertos en la materia. Se entenderá por los expertos en la materia que los ensayos de detección de virulencia, como se describe acá y como será bien conocido en el arte, pueden ser usados para distinguir entre estructuras base virulentas y atenuadas. Se contempla cualquiera las técnicas de mutagénesis discutidas en la Solicitud PCT No.
20 PCT/US2007/076004 (DESARROLLO DE COMPONENTES DE VACUNA DE VIRUS DE DENGUE).

[0131] **Construcción de Quimeras de Flavivirus de Zika**

[0132] Las quimeras de flavivirus descritas acá pueden ser producidas al sustituir por lo menos uno de los genes de proteína estructural del ZIKV contra el cual se
25 desea inmunidad en una base de genoma de virus de dengue, usando técnicas de ingeniería recombinante bien conocidas para los expertos en la materia, específicamente, removiendo un gen de virus de dengue designado y reemplazándolo con el gen correspondiente deseado de ZIKV. Alternativamente,

usando las secuencias provistas en GenBank, las moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas de flavivirus se pueden sintetizar usando técnicas conocidas de síntesis de ácido nucleico e insertando en un vector adecuado. El virus inmunogénico y atenuado, por lo tanto, es producido usando técnicas de ingeniería recombinante conocidas para los expertos en la materia.

[0133] Como se mencionó anteriormente, el gen a insertar en la base codifica una proteína estructural de ZIKV. Preferiblemente, el gen de ZIKV a insertar es un gen que codifica una proteína C, una proteína prM y/o una proteína E. La secuencia insertada en la base del virus de dengue puede codificar las proteínas estructurales prM y E. La secuencia insertada en la base del virus de dengue puede codificar las proteínas estructurales C, prM y E. La base de virus de dengue es el genoma de virus DEN1, DEN2, DEN3, o DEN4, o un genoma de virus de dengue atenuado de cualquiera de estos serotipos, e incluye los genes sustituidos que codifican la proteína estructural C, prM y/o E de un ZIKV o el gen sustituido que codifica la proteína estructural prM y/o E de un ZIKV.

[0134] Virus quiméricos adecuados o quimeras de ácido nucleico que contienen las secuencias de nucleótido que codifican las proteínas estructurales de ZIKV pueden ser evaluados para utilidad como vacunas al detectarlos para marcadores fenotípicos de atenuación que indica la reducción en virulencia con retención de inmunogenicidad. La antigenicidad y la inmunogenicidad se pueden evaluar usando reactividad in vitro o in vivo con anticuerpos Zika o suero inmunorreactivo usando procedimientos de detección de rutina conocidos para los expertos en la materia.

[0135] **Vacunas de Flavivirus**

[0136] Los virus quiméricos preferidos y las quimeras de ácido nucleico suministran virus atenuados y vivos útiles como inmunógenos o vacunas. En una modalidad preferida, las quimeras exhiben alta inmunogenicidad mientras que al mismo tiempo no producen efectos patogénicos peligrosos o letales.

[0137] Los virus quiméricos o las quimeras de ácido nucleico de esta invención pueden comprender los genes estructurales de un ZIKV en un tipo salvaje o una base de virus de dengue atenuado. Por ejemplo, la quimera puede expresar los genes de proteína estructural de un ZIKV en cualquiera de un virus de dengue o una base de virus de dengue atenuado.

[0138] La estrategia descrita acá de utilizar una base genética que contiene regiones no estructurales de un genoma de virus de dengue, y, por quimerización, las propiedades de atenuación, para expresar los genes de proteína estructural de un ZIKV ha llevado al desarrollo de candidatos de vacuna de flavivirus atenuado y vivo que expresan los genes de proteína estructural de inmunogenicidad deseada. Por lo tanto, se pueden designar los candidatos de vacuna para el control de patógenos de ZIKV.

[0139] Los virus usados en las quimeras descritas acá se crecen típicamente usando técnicas conocidas en el arte. Las valoraciones de la placa de virus o de unidad formadora de foco (FFU) luego se realizan y se cuentan las placas o FFU con el fin de evaluar la viabilidad, valor y características fenotípicas del virus crecido en el cultivo celular. Los virus de tipo salvaje son mutagenizados para derivar materiales de inicio candidatos atenuados.

[0140] Los clones infecciosos quiméricos son construidos a partir de varias cepas de flavivirus. La clonación de fragmentos de cADN específicos de virus también se puede lograr, si se desea. Los fragmentos de cADN que contienen los genes de proteína estructural o de proteína no estructural se amplifican por reacción en cadena de polimerasa transcriptasa inversa (RT-PCR) a partir de ARN de flavivirus con varios cebadores. Los fragmentos amplificados son clonados en sitios de escisión de otros clones intermediarios. Los clones de flavivirus quiméricos intermediarios luego son secuenciados para verificar la secuencia del cADN específico de flavivirus insertado.

[0141] Los plásmidos quiméricos de longitud de genoma completo contruidos al insertar la región de gen de proteína estructura o no estructural de flavivirus en vectores se obtienen usando técnicas recombinantes bien conocidas para los expertos en la materia.

5 [0142] **Vacuna de Quimera de Flavivirus Multivalente y Pentavalente**

[0143] La presente divulgación no sólo se relaciona con Zika y virus quiméricos de Zika para uso como vacunas y con dichas vacunas como tal, sino también con vacunas multivalentes que comprenden la combinación de al menos dos vacunas diferentes, en donde al menos una vacuna es una vacuna contra ZIKV. En otras
10 palabras, la divulgación contempla la combinación de una o más vacunas de Zika (por ejemplo, un ZIKV atenuado, un ZIKV atenuado quimérico, o ambos) con una o más vacunas adicionales para otros patógenos. En ciertas modalidades, la una o más vacunas adicionales son vacunas de flavivirus. La una o más vacunas adicionales se pueden seleccionar de cualquier vacuna de flavivirus, tal como, pero
15 no limitada a, una vacuna de dengue (contra DEN1, DEN2, DEN3, o DEN4, o combinaciones de los mismos), vacuna de virus de fiebre amarilla, vacuna JEV, vacuna TBEV, vacuna de virus del oeste del Nilo, o combinaciones de las mismas.

[0144] En ciertas modalidades, una vacuna multivalente comprende:

[0145] (a) una o más vacunas de Zika (por ejemplo, ZIKV atenuado o ZIKV atenuado
20 quimérico), combinada con una, dos, tres, cuatro, o cinco vacunas de flavivirus adicionales;

[0146] (b) una o más vacunas de Zika (por ejemplo, ZIKV atenuado o ZIKV atenuado quimérico), combinada con una, dos, tres, cuatro, o cinco vacunas adicionales de dengue (contra DEN1, DEN2, DEN3, DEN4, quimeras de los mismos, o
25 combinaciones de los mismos);

[0147] (c) una vacuna de ZIKV atenuado quimérico combinada con una o más vacunas de virus de dengue, dichas vacunas de virus de dengue cada una

comprende por lo menos uno de un virus DEN1, DEN2, DEN3, o DEN4, o quiméricos de los mismos, o combinaciones de los mismos; y

[0148] (d) una vacuna de ZIKV atenuado quimérico combinado con una vacuna de virus DEN1, una vacuna de virus DEN2, una vacuna de virus DEN3, y una vacuna de virus DEN4, o quiméricos de los mismos, es decir, para suministrar una vacuna pentavalente.

[0149] En cualquier modalidad relacionada con vacunas multivalentes y/o pentavalentes, la una o más vacunas de flavivirus adicionales pueden comprender flavivirus que comprenden una o más mutaciones de atenuación, incluyendo eliminaciones y/o mutaciones en el 3'UTR, por ejemplo, mutaciones de atenuación $\Delta 30$, $\Delta 30/31$, y $\Delta 86$.

[0150] La descripción suministra un conjunto de componentes de vacuna de flavivirus atenuado vivo, de tipo específico (por ejemplo, virus de dengue) que se puede formular en una vacuna de flavivirus multivalente segura, efectiva, y económica (por ejemplo, bivalente, trivalente, tetravalente, o pentavalente) con un ZIKV atenuado o quimera de Zika. La mutación $\Delta 30$ atenúa DEN2 y DEN4 en monos Rhesus. La mutación $\Delta 30$ remueve una estructura homóloga (TL-2) en cada uno de los serotipos 1, 2, 3, y 4 de virus de dengue (Figuras 2B, 3B, 4B, y 5B). Sin embargo, se encontró que la mutación $\Delta 30$ no atenúa DEN3 en la misma medida que en DEN2 y DEN4 en monos Rhesus. En contraste, se encontró que la mutación $\Delta 30$ atenúa DEN1 en una mayor medida que DEN2 y DEN4.

[0151] En ciertas modalidades, la descripción suministra flavivirus (por ejemplo, virus de dengue) y flavivirus quiméricos (por ejemplo, virus de dengue) que tienen una o más mutaciones que resultan en atenuación, métodos para hacer dichos virus de dengue, y métodos para usar estos flavivirus para prevenir o tratar infección por flavivirus (por ejemplo, infección de virus de dengue). La mutación (o mutaciones) en el virus de dengue de la invención está presente en la región 3' sin traducir (3'-UTR) formada por la mayoría de aproximadamente 384 nucleótidos más hacia abajo

del ARN viral, los cuales han mostrado que juegan un papel en la determinación de la atenuación. Los virus y métodos de la invención se describen en detalle a continuación. Se utiliza un acercamiento molecular para desarrollar una composición o vacuna inmunogénica de virus flavivirus, Zika multivalente (por ejemplo, pentavalente) atenuado vivo genéticamente estable. La composición inmunogénica multivalente comprende: por lo menos un virus atenuado que es inmunogénico contra un flavivirus, y un segundo virus atenuado que es inmunogénico contra ZIKV. En una modalidad particular, el primer virus atenuado es inmunogénico contra un virus seleccionado del grupo que consiste de: virus de dengue (por ejemplo, DEN1, DEN2, DEN3, DEN4, o una combinación de los mismos), virus del oeste del Nilo, virus de fiebre amarilla, virus de encefalitis Japonesa, virus de encefalitis transmitida por garrapata, o combinaciones de los mismos. En otra modalidad, el segundo virus atenuado es una quimera de ácido nucleico de Zika de acuerdo con la presente divulgación. En otra modalidad particular, el segundo virus atenuado es un ZIKV que comprende una o más mutaciones de atenuación en el genoma. Cada componente de la vacuna multivalente debe ser atenuado, genéticamente estable e inmunogénico.

[0152] Por ejemplo, cada componente de la vacuna pentavalente, por ejemplo, DEN1, DEN2, Den3, DEN4, y ZIKV, debe ser atenuado, genéticamente estable, e inmunogénico. La vacuna pentavalente asegurará protección simultánea contra cada uno de los cuatro virus de dengue, precluyendo de esta forma la posibilidad de desarrollar las enfermedades más graves de dengue de fiebre hemorrágica/síndrome de choque de dengue (DHF/DSS), las cuales ocurren en humanos durante la infección secundaria con un virus de dengue heterotípico de tipo salvaje. Dado que los virus de dengue pueden someterse a recombinación genética en la naturaleza, la vacuna pentavalente será genéticamente incapaz de someterse a un evento de recombinación entre sus cinco componentes de virus que pudiera llevar a la generación de virus que carecen de mutaciones de atenuación.

Los acercamientos anteriores para desarrollar una vacuna pentavalente de virus de dengue han estado basados en derivar de forma independiente cada uno de los cuatro componentes de virus a través de procedimiento mutagénicos separados, tal como el paso en células de cultivo de tejido derivadas de un huésped heterólogo.

- 5 Esta estrategia ha producido candidatos de vacuna atenuada previamente. Sin embargo, es posible que los intercambios de gen entre los cuatro componentes de estas vacunas tetravalentes derivadas independientemente puedan ocurrir en vacunas, posiblemente creando un virus recombinante virulento. Los poliovirus virulentos derivados de la recombinación han sido generados en vacunas después
- 10 de la administración de una vacuna de poliovirus tetravalente.

[0153] En ciertos aspectos, la presente divulgación suministra una vacuna pentavalente que puede incluir: (1) quimera de Zika atenuado de acuerdo con la presente divulgación, rDEN4 Δ 30 y virus recombinante de rDEN1 Δ 30, rDEN2 Δ 30, y rDEN3 Δ 30 que contienen una eliminación de 30 nucleótidos (Δ 30) en una sección

15 de la región 3' sin traducir (UTR) que es homóloga a la del virus recombinante rDEN4 Δ 30; (2) quimera de Zika de ácido nucleico atenuado de acuerdo con la presente divulgación, rDEN1 Δ 30, rDEN2 Δ 30, rDEN3 Δ 30, y rDEN4 Δ 30; (3) virus quiméricos antigénicos atenuados, rDEN1/4 Δ 30, rDEN2/4 Δ 30, y rDEN3/4 Δ 30, para los cuales las regiones de gen CME, ME, o E de rDEN4 Δ 30 se han reemplazado

20 con los derivados de DEN1, DEN2, o DEN3, rDEN4 Δ 30, y quimera de Zika; alternativamente rDEN1/3 Δ 30, rDEN3/2 Δ 30, y rDEN4/2 Δ 30 para los cuales las regiones de gen CME, ME, o E de rDEN2 Δ 30 se han reemplazado con los derivados de DEN1, 3, o 4, rDEN2 Δ 30, y quimera de Zika; y alternativamente rDEN2/1 Δ 30, rDEN3/1 Δ 30, y rDEN4/1 Δ 30 para los cuales las regiones de gen CME, ME, o E de

25 rDEN1 Δ 30 se han reemplazado con los derivados de DEN2, 3, o 4, rDEN1 Δ 30, y quimera de Zika; y (4) rDEN1/4 Δ 30, rDEN2/4 Δ 30, rDEN3/4 Δ 30, rDEN4 Δ 30, y quimera de Zika atenuados; alternativamente rDEN1/3 Δ 30, rDEN2/3 Δ 30, rDEN4/3 Δ 30, rDEN3 Δ 30, y quimera de Zika; alternativamente rDEN1/2 Δ 30,

rDEN3/2Δ30, rDEN4/2Δ30, rDEN2Δ30, y quimera de Zika; y alternativamente rDEN2/1Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/1Δ30, rDEN1Δ30, y quimera de Zika. Estas vacunas pentavalentes son únicas datos que ellas contienen una mutación de atenuación compartida común la cual elimina la posibilidad de generar un virus de tipo salvaje virulento en una vacuna dado que cada componente de la vacuna posee la misma mutación de eliminación de atenuación Δ30. Adicionalmente, la vacuna pentavalente rDEN1Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4Δ30, quimera de Zika es la primera en combinar la estabilidad de la mutación Δ30 con antigenicidad amplia. Alternativamente, utilizando el mismo esquema, las eliminaciones Δ30, Δ30/31 o Δ86 del 3'UTR pueden ser utilizadas en los esquemas de quimera descritos anteriormente, o dentro de DEN1, DEN2, DEN3, DEN4, y quimera de Zika. Dado que la mutación de eliminación Δ30, Δ30/31, y Δ86 está en el 3'UTR de cada virus, todas las proteínas de los cinco virus de componente están disponibles para inducir una respuesta inmune protectora. Así, el método suministra un mecanismo de atenuación que mantiene cada una de las proteínas de los virus DEN1, DEN2, DEN3, DEN4, y quimera de Zika en un estado que conserva toda la capacidad de cada una de las proteínas de los cinco virus de inducir respuestas inmunes humorales y celulares contra todas las proteínas estructurales y no estructurales presentes en cada serotipo de virus de dengue y ZIKV.

[0154] Como se describió anteriormente, el virus recombinante DEN4, rDEN4Δ30 (previamente referido como 2AΔ30), fue modificado para contener una eliminación de 30 nucleótidos en el 3'UTR del genoma viral (Durbin, A. P. y otros 2001 Am J Trop Med Hyg 65:405-13; Men, R, y otros 1996 J Virol 70:3930-7). La evaluación en monos Rhesus mostró que el virus es significativamente atenuado con relación al virus parental de tipo salvaje, aunque altamente inmunogénico y completamente protector. También, un ensayo clínico de fase I con voluntarios humanos adultos mostró que el virus recombinante rDEN4Δ30 es seguro y satisfactoriamente inmunogénico (Durbin, A. P. y otros 2001 Am J Trop Med Hyg 65:405-13). Para

desarrollar una vacuna pentavalente con una mutación de atenuación compartida en una región sin traducir, se puede utilizar la eliminación $\Delta 30$, $\Delta 31$, $\Delta 30/31$, o $\Delta 86$ para atenuar los virus de dengue de tipo salvaje de serotipos 1, 2, y 3 dado que atenuó el virus DEN4 de tipo salvaje para monos Rhesus y fue seguro en humanos.

5 Publicación de Solicitud de Patente US 2007/0009552.

[0155] De acuerdo con un aspecto, la presente divulgación suministra una composición inmunogénica pentavalente que comprende: un primer virus atenuado que es inmunogénico contra el serotipo 1 de dengue (DEN1), un segundo virus atenuado que es inmunogénico contra el serotipo 2 de dengue (DEN2), un tercer
10 virus atenuado que es inmunogénico contra el serotipo 3 de dengue (DEN3), un cuarto virus atenuado que es inmunogénico contra el serotipo 4 de dengue (DEN4), y un quinto virus atenuado que es inmunogénico contra ZIKV. En una modalidad particular, el quinto virus atenuado es la quimera de ácido nucleico de Zika de acuerdo con la presente divulgación.

15 [0156] En una modalidad, el primer, segundo, tercer, y cuarto virus se seleccionan del grupo que consiste de: (1) rDEN1 $\Delta 30$, rDEN2 $\Delta 30$, rDEN3 $\Delta 30$, rDEN4 $\Delta 30$, (2) rDEN1 $\Delta 30$, rDEN2 $\Delta 30$, rDEN3 $\Delta 30$, rDEN4/1 $\Delta 30$, (3) rDEN1 $\Delta 30$, rDEN2 $\Delta 30$, rDEN3 $\Delta 30$, rDEN4/2 $\Delta 30$, (4) rDEN1 $\Delta 30$, rDEN2 $\Delta 30$, rDEN3 $\Delta 30$, rDEN4/3 $\Delta 30$, (5) rDEN1 $\Delta 30$, rDEN2 $\Delta 30$, rDEN3/1 $\Delta 30$, rDEN4 $\Delta 30$, (6) rDEN1 $\Delta 30$, rDEN2 $\Delta 30$,
20 rDEN3/1 $\Delta 30$, rDEN4/1 $\Delta 30$, (7) rDEN1 $\Delta 30$, rDEN2 $\Delta 30$, rDEN3/1 $\Delta 30$, rDEN4/2 $\Delta 30$, (8) rDEN1 $\Delta 30$, rDEN2 $\Delta 30$, rDEN3/1 $\Delta 30$, rDEN4/3 $\Delta 30$, (9) rDEN1 $\Delta 30$, rDEN2 $\Delta 30$, rDEN3/2 $\Delta 30$, rDEN4 $\Delta 30$, (10) rDEN1 $\Delta 30$, rDEN2 $\Delta 30$, rDEN3/2 $\Delta 30$, rDEN4/1 $\Delta 30$, (11) rDEN1 $\Delta 30$, rDEN2 $\Delta 30$, rDEN3/2 $\Delta 30$, rDEN4/2 $\Delta 30$, (12) rDEN1 $\Delta 30$, rDEN2 $\Delta 30$, rDEN3/2 $\Delta 30$, rDEN4/3 $\Delta 30$, (13) rDEN1 $\Delta 30$, rDEN2 $\Delta 30$, rDEN3/4 $\Delta 30$,
25 rDEN4 $\Delta 30$, (14) rDEN1 $\Delta 30$, rDEN2 $\Delta 30$, rDEN3/4 $\Delta 30$, rDEN4/1 $\Delta 30$, (15) rDEN1 $\Delta 30$, rDEN2 $\Delta 30$, rDEN3/4 $\Delta 30$, rDEN4/2 $\Delta 30$, (16) rDEN1 $\Delta 30$, rDEN2 $\Delta 30$, rDEN3/4 $\Delta 30$, rDEN4/3 $\Delta 30$, (17) rDEN1 $\Delta 30$, rDEN2/1 $\Delta 30$, rDEN3 $\Delta 30$, rDEN4 $\Delta 30$, (18) rDEN1 $\Delta 30$, rDEN2/1 $\Delta 30$, rDEN3 $\Delta 30$, rDEN4/1 $\Delta 30$, (19) rDEN1 $\Delta 30$,

rDEN2/1Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/2Δ30, (20) rDEN1Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3Δ30,
 rDEN4/3Δ30, (21) rDEN1Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4Δ30, (22)
 rDEN1Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/1Δ30, (23) rDEN1Δ30, rDEN2/1Δ30,
 rDEN3/1Δ30, rDEN4/2Δ30, (24) rDEN1Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/1Δ30,
 5 rDEN4/3Δ30, (25) rDEN1Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4Δ30, (26)
 rDEN1Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/1Δ30, (27) rDEN1Δ30, rDEN2/1Δ30,
 rDEN3/2Δ30, rDEN4/2Δ30, (28) rDEN1Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/2Δ30,
 rDEN4/3Δ30, (29) rDEN1Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4Δ30, (30)
 rDEN1Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/1Δ30, (31) rDEN1Δ30, rDEN2/1Δ30,
 10 rDEN3/4Δ30, rDEN4/2Δ30, (32) rDEN1Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/4Δ30,
 rDEN4/3Δ30, (33) rDEN1Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4Δ30, (34)
 rDEN1Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/1Δ30, (35) rDEN1Δ30, rDEN2/3Δ30,
 rDEN3Δ30, rDEN4/2Δ30, (36) rDEN1Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/3Δ30,
 (37) rDEN1Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4Δ30, (38) rDEN1Δ30,
 15 rDEN2/3Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/1Δ30, (39) rDEN1Δ30, rDEN2/3Δ30,
 rDEN3/1Δ30, rDEN4/2Δ30, (40) rDEN1Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/1Δ30,
 rDEN4/3Δ30, (41) rDEN1Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4Δ30, (42)
 rDEN1Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/1Δ30, (43) rDEN1Δ30, rDEN2/3Δ30,
 rDEN3/2Δ30, rDEN4/2Δ30, (44) rDEN1Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/2Δ30,
 20 rDEN4/3Δ30, (45) rDEN1Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4Δ30, (46)
 rDEN1Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/1Δ30, (47) rDEN1Δ30, rDEN2/3Δ30,
 rDEN3/4Δ30, rDEN4/2Δ30, (48) rDEN1Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/4Δ30,
 rDEN4/3Δ30, (49) rDEN1Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4Δ30, (50)
 rDEN1Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/1Δ30, (51) rDEN1Δ30, rDEN2/4Δ30,
 25 rDEN3Δ30, rDEN4/2Δ30, (52) rDEN1Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/3Δ30,
 (53) rDEN1Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4Δ30, (54) rDEN1Δ30,
 rDEN2/4Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/1Δ30, (55) rDEN1Δ30, rDEN2/4Δ30,
 rDEN3/1Δ30, rDEN4/2Δ30, (56) rDEN1Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/1Δ30,

rDEN4/3Δ30, (57) rDEN1Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4Δ30, (58)
 rDEN1Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/1Δ30, (59) rDEN1Δ30, rDEN2/4Δ30,
 rDEN3/2Δ30, rDEN4/2Δ30, (60) rDEN1Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/2Δ30,
 rDEN4/3Δ30, (61) rDEN1Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4Δ30, (62)
 5 rDEN1Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/1Δ30, (63) rDEN1Δ30, rDEN2/4Δ30,
 rDEN3/4Δ30, rDEN4/2Δ30, (64) rDEN1Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/4Δ30,
 rDEN4/3Δ30, (65) rDEN1/2Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4Δ30, (66)
 rDEN1/2Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/1Δ30, (67) rDEN1/2Δ30, rDEN2Δ30,
 rDEN3Δ30, rDEN4/2Δ30, (68) rDEN1/2Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/3Δ30,
 10 (69) rDEN1/2Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4Δ30, (70) rDEN1/2Δ30,
 rDEN2Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/1Δ30, (71) rDEN1/2Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/1Δ30,
 rDEN4/2Δ30, (72) rDEN1/2Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/3Δ30, (73)
 rDEN1/2Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4Δ30, (74) rDEN1/2Δ30, rDEN2Δ30,
 rDEN3/2Δ30, rDEN4/1Δ30, (75) rDEN1/2Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/2Δ30,
 15 rDEN4/2Δ30, (76) rDEN1/2Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/3Δ30, (77)
 rDEN1/2Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4Δ30, (78) rDEN1/2Δ30, rDEN2Δ30,
 rDEN3/4Δ30, rDEN4/1Δ30, (79) rDEN1/2Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/4Δ30,
 rDEN4/2Δ30, (80) rDEN1/2Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/3Δ30, (81)
 rDEN1/2Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4Δ30, (82) rDEN1/2Δ30, rDEN2/1Δ30,
 20 rDEN3Δ30, rDEN4/1Δ30, (83) rDEN1/2Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/2Δ30,
 (84) rDEN1/2Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/3Δ30, (85) rDEN1/2Δ30,
 rDEN2/1Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4Δ30, (86) rDEN1/2Δ30, rDEN2/1Δ30,
 rDEN3/1Δ30, rDEN4/1Δ30, (87) rDEN1/2Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/1Δ30,
 rDEN4/2Δ30, (88) rDEN1/2Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/3Δ30, (89)
 25 rDEN1/2Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4Δ30, (90) rDEN1/2Δ30,
 rDEN2/1Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/1Δ30, (91) rDEN1/2Δ30, rDEN2/1Δ30,
 rDEN3/2Δ30, rDEN4/2Δ30, (92) rDEN1/2Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/2Δ30,
 rDEN4/3Δ30, (93) rDEN1/2Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4Δ30, (94)

rDEN1/2Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/1Δ30, (95) rDEN1/2Δ30,
 rDEN2/1Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/2Δ30, (96) rDEN1/2Δ30, rDEN2/1Δ30,
 rDEN3/4Δ30, rDEN4/3Δ30, (97) rDEN1/2Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4Δ30,
 (98) rDEN1/2Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/1Δ30, (99) rDEN1/2Δ30,
 5 rDEN2/3Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/2Δ30, (100) rDEN1/2Δ30, rDEN2/3Δ30,
 rDEN3Δ30, rDEN4/3Δ30, (101) rDEN1/2Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/1Δ30,
 rDEN4Δ30, (102) rDEN1/2Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/1Δ30, (103)
 rDEN1/2Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/2Δ30, (104) rDEN1/2Δ30,
 rDEN2/3Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/3Δ30, (105) rDEN1/2Δ30, rDEN2/3Δ30,
 10 rDEN3/2Δ30, rDEN4Δ30, (106) rDEN1/2Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/2Δ30,
 rDEN4/1Δ30, (107) rDEN1/2Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/2Δ30, (108)
 rDEN1/2Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/3Δ30, (109) rDEN1/2Δ30,
 rDEN2/3Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4Δ30, (110) rDEN1/2Δ30, rDEN2/3Δ30,
 rDEN3/4Δ30, rDEN4/1Δ30, (111) rDEN1/2Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/4Δ30,
 15 rDEN4/2Δ30, (112) rDEN1/2Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/3Δ30, (113)
 rDEN1/2Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4Δ30, (114) rDEN1/2Δ30,
 rDEN2/4Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/1Δ30, (115) rDEN1/2Δ30, rDEN2/4Δ30,
 rDEN3Δ30, rDEN4/2Δ30, (116) rDEN1/2Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3Δ30,
 rDEN4/3Δ30, (117) rDEN1/2Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4Δ30, (118)
 20 rDEN1/2Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/1Δ30, (119) rDEN1/2Δ30,
 rDEN2/4Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/2Δ30, (120) rDEN1/2Δ30, rDEN2/4Δ30,
 rDEN3/1Δ30, rDEN4/3Δ30, (121) rDEN1/2Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/2Δ30,
 rDEN4Δ30, (122) rDEN1/2Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/1Δ30, (123)
 rDEN1/2Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/2Δ30, (124) rDEN1/2Δ30,
 25 rDEN2/4Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/3Δ30, (125) rDEN1/2Δ30, rDEN2/4Δ30,
 rDEN3/4Δ30, rDEN4Δ30, (126) rDEN1/2Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/4Δ30,
 rDEN4/1Δ30, (127) rDEN1/2Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/2Δ30, (128)
 rDEN1/2Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/3Δ30, (129) rDEN1/3Δ30,

rDEN2Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4Δ30, (130) rDEN1/3Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3Δ30,
 rDEN4/1Δ30, (131) rDEN1/3Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/2Δ30, (132)
 rDEN1/3Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/3Δ30, (133) rDEN1/3Δ30, rDEN2Δ30,
 rDEN3/1Δ30, rDEN4Δ30, (134) rDEN1/3Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/1Δ30,
 5 rDEN4/1Δ30, (135) rDEN1/3Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/2Δ30, (136)
 rDEN1/3Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/3Δ30, (137) rDEN1/3Δ30,
 rDEN2Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4Δ30, (138) rDEN1/3Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/2Δ30,
 rDEN4/1Δ30, (139) rDEN1/3Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/2Δ30, (140)
 rDEN1/3Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/3Δ30, (141) rDEN1/3Δ30,
 10 rDEN2Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4Δ30, (142) rDEN1/3Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/4Δ30,
 rDEN4/1Δ30, (143) rDEN1/3Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/2Δ30, (144)
 rDEN1/3Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/3Δ30, (145) rDEN1/3Δ30,
 rDEN2/1Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4Δ30, (146) rDEN1/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3Δ30,
 rDEN4/1Δ30, (147) rDEN1/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/2Δ30, (148)
 15 rDEN1/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/3Δ30, (149) rDEN1/3Δ30,
 rDEN2/1Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4Δ30, (150) rDEN1/3Δ30, rDEN2/1Δ30,
 rDEN3/1Δ30, rDEN4/1Δ30, (151) rDEN1/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/1Δ30,
 rDEN4/2Δ30, (152) rDEN1/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/3Δ30, (153)
 rDEN1/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4Δ30, (154) rDEN1/3Δ30,
 20 rDEN2/1Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/1Δ30, (155) rDEN1/3Δ30, rDEN2/1Δ30,
 rDEN3/2Δ30, rDEN4/2Δ30, (156) rDEN1/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/2Δ30,
 rDEN4/3Δ30, (157) rDEN1/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4Δ30, (158)
 rDEN1/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/1Δ30, (159) rDEN1/3Δ30,
 rDEN2/1Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/2Δ30, (160) rDEN1/3Δ30, rDEN2/1Δ30,
 25 rDEN3/4Δ30, rDEN4/3Δ30, (161) rDEN1/3Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3Δ30,
 rDEN4Δ30, (162) rDEN1/3Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/1Δ30, (163)
 rDEN1/3Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/2Δ30, (164) rDEN1/3Δ30,
 rDEN2/3Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/3Δ30, (165) rDEN1/3Δ30, rDEN2/3Δ30,

rDEN3/1Δ30, rDEN4Δ30, (166) rDEN1/3Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/1Δ30,
 rDEN4/1Δ30, (167) rDEN1/3Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/2Δ30, (168)
 rDEN1/3Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/3Δ30, (169) rDEN1/3Δ30,
 rDEN2/3Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4Δ30, (170) rDEN1/3Δ30, rDEN2/3Δ30,
 5 rDEN3/2Δ30, rDEN4/1Δ30, (171) rDEN1/3Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/2Δ30,
 rDEN4/2Δ30, (172) rDEN1/3Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/3Δ30, (173)
 rDEN1/3Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4Δ30, (174) rDEN1/3Δ30,
 rDEN2/3Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/1Δ30, (175) rDEN1/3Δ30, rDEN2/3Δ30,
 rDEN3/4Δ30, rDEN4/2Δ30, (176) rDEN1/3Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/4Δ30,
 10 rDEN4/3Δ30, (177) rDEN1/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4Δ30, (178)
 rDEN1/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/1Δ30, (179) rDEN1/3Δ30,
 rDEN2/4Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/2Δ30, (180) rDEN1/3Δ30, rDEN2/4Δ30,
 rDEN3Δ30, rDEN4/3Δ30, (181) rDEN1/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/1Δ30,
 rDEN4Δ30, (182) rDEN1/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/1Δ30, (183)
 15 rDEN1/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/2Δ30, (184) rDEN1/3Δ30,
 rDEN2/4Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/3Δ30, (185) rDEN1/3Δ30, rDEN2/4Δ30,
 rDEN3/2Δ30, rDEN4Δ30, (186) rDEN1/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/2Δ30,
 rDEN4/1Δ30, (187) rDEN1/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/2Δ30, (188)
 rDEN1/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/3Δ30, (189) rDEN1/3Δ30,
 20 rDEN2/4Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4Δ30, (190) rDEN1/3Δ30, rDEN2/4Δ30,
 rDEN3/4Δ30, rDEN4/1Δ30, (191) rDEN1/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/4Δ30,
 rDEN4/2Δ30, (192) rDEN1/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/3Δ30, (193)
 rDEN1/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4Δ30, (194) rDEN1/4Δ30, rDEN2Δ30,
 rDEN3Δ30, rDEN4/1Δ30, (195) rDEN1/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/2Δ30,
 25 (196) rDEN1/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/3Δ30, (197) rDEN1/4Δ30,
 rDEN2Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4Δ30, (198) rDEN1/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/1Δ30,
 rDEN4/1Δ30, (199) rDEN1/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/2Δ30, (200)
 rDEN1/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/3Δ30, (201) rDEN1/4Δ30,

rDEN2Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4Δ30, (202) rDEN1/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/2Δ30,
 rDEN4/1Δ30, (203) rDEN1/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/2Δ30, (204)
 rDEN1/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/3Δ30, (205) rDEN1/4Δ30,
 rDEN2Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4Δ30, (206) rDEN1/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/4Δ30,
 5 rDEN4/1Δ30, (207) rDEN1/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/2Δ30, (208)
 rDEN1/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/3Δ30, (209) rDEN1/4Δ30,
 rDEN2/1Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4Δ30, (210) rDEN1/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3Δ30,
 rDEN4/1Δ30, (211) rDEN1/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/2Δ30, (212)
 rDEN1/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/3Δ30, (213) rDEN1/4Δ30,
 10 rDEN2/1Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4Δ30, (214) rDEN1/4Δ30, rDEN2/1Δ30,
 rDEN3/1Δ30, rDEN4/1Δ30, (215) rDEN1/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/1Δ30,
 rDEN4/2Δ30, (216) rDEN1/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/3Δ30, (217)
 rDEN1/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4Δ30, (218) rDEN1/4Δ30,
 rDEN2/1Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/1Δ30, (219) rDEN1/4Δ30, rDEN2/1Δ30,
 15 rDEN3/2Δ30, rDEN4/2Δ30, (220) rDEN1/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/2Δ30,
 rDEN4/3Δ30, (221) rDEN1/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4Δ30, (222)
 rDEN1/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/1Δ30, (223) rDEN1/4Δ30,
 rDEN2/1Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/2Δ30, (224) rDEN1/4Δ30, rDEN2/1Δ30,
 rDEN3/4Δ30, rDEN4/3Δ30, (225) rDEN1/4Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3Δ30,
 20 rDEN4Δ30, (226) rDEN1/4Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/1Δ30, (227)
 rDEN1/4Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/2Δ30, (228) rDEN1/4Δ30,
 rDEN2/3Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/3Δ30, (229) rDEN1/4Δ30, rDEN2/3Δ30,
 rDEN3/1Δ30, rDEN4Δ30, (230) rDEN1/4Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/1Δ30,
 rDEN4/1Δ30, (231) rDEN1/4Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/2Δ30, (232)
 25 rDEN1/4Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/3Δ30, (233) rDEN1/4Δ30,
 rDEN2/3Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4Δ30, (234) rDEN1/4Δ30, rDEN2/3Δ30,
 rDEN3/2Δ30, rDEN4/1Δ30, (235) rDEN1/4Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/2Δ30,
 rDEN4/2Δ30, (236) rDEN1/4Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/3Δ30, (237)

rDEN1/4Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4Δ30, (238) rDEN1/4Δ30,
 rDEN2/3Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/1Δ30, (239) rDEN1/4Δ30, rDEN2/3Δ30,
 rDEN3/4Δ30, rDEN4/2Δ30, (240) rDEN1/4Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/4Δ30,
 rDEN4/3Δ30, (241) rDEN1/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4Δ30, (242)
 5 rDEN1/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/1Δ30, (243) rDEN1/4Δ30,
 rDEN2/4Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/2Δ30, (244) rDEN1/4Δ30, rDEN2/4Δ30,
 rDEN3Δ30, rDEN4/3Δ30, (245) rDEN1/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/1Δ30,
 rDEN4Δ30, (246) rDEN1/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/1Δ30, (247)
 rDEN1/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/2Δ30, (248) rDEN1/4Δ30,
 10 rDEN2/4Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/3Δ30, (249) rDEN1/4Δ30, rDEN2/4Δ30,
 rDEN3/2Δ30, rDEN4Δ30, (250) rDEN1/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/2Δ30,
 rDEN4/1Δ30, (251) rDEN1/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/2Δ30, (252)
 rDEN1/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/3Δ30, (253) rDEN1/4Δ30,
 rDEN2/4Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4Δ30, (254) rDEN1/4Δ30, rDEN2/4Δ30,
 15 rDEN3/4Δ30, rDEN4/1Δ30, (255) rDEN1/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/4Δ30,
 rDEN4/2Δ30, y (256) rDEN1/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/3Δ30. En
 otra modalidad, el quinto virus atenuado de la composición inmunogénica
 pentavalente de cualquiera de las combinaciones del primer, segundo, tercero y
 cuarto virus atenuados descritos anteriormente es una quimera de Zika de la
 20 presente divulgación, como se describe en mayor detalle más adelante. En una
 modalidad, cada uno de los virus atenuados comprende la misma base de dengue.
 En otra modalidad, el quinto virus atenuado comprende una base de virus de
 dengue diferente del primer, segundo, tercer, y cuarto virus atenuados.

[0157] En una modalidad, el primer, segundo, tercer, y cuarto virus atenuados se
 25 seleccionan del grupo que consiste de: (1) rDEN1Δ31, rDEN2Δ31, rDEN3Δ31,
 rDEN4Δ31, (2) rDEN1Δ31, rDEN2Δ31, rDEN3Δ31, rDEN4/1Δ31, (3) rDEN1Δ31,
 rDEN2Δ31, rDEN3Δ31, rDEN4/2Δ31, (4) rDEN1Δ31, rDEN2Δ31, rDEN3Δ31,
 rDEN4/3Δ31, (5) rDEN1Δ31, rDEN2Δ31, rDEN3/1Δ31, rDEN4Δ31, (6) rDEN1Δ31,

rDEN2Δ31, rDEN3/1Δ31, rDEN4/1Δ31, (7) rDEN1Δ31, rDEN2Δ31, rDEN3/1Δ31,
 rDEN4/2Δ31, (8) rDEN1Δ31, rDEN2Δ31, rDEN3/1Δ31, rDEN4/3Δ31, (9) rDEN1Δ31,
 rDEN2Δ31, rDEN3/2Δ31, rDEN4Δ31, (10) rDEN1Δ31, rDEN2Δ31, rDEN3/2Δ31,
 rDEN4/1Δ31, (11) rDEN1Δ31, rDEN2Δ31, rDEN3/2Δ31, rDEN4/2Δ31, (12)
 5 rDEN1Δ31, rDEN2Δ31, rDEN3/2Δ31, rDEN4/3Δ31, (13) rDEN1Δ31, rDEN2Δ31,
 rDEN3/4Δ31, rDEN4Δ31, (14) rDEN1Δ31, rDEN2Δ31, rDEN3/4Δ31, rDEN4/1Δ31,
 (15) rDEN1Δ31, rDEN2Δ31, rDEN3/4Δ31, rDEN4/2Δ31, (16) rDEN1Δ31,
 rDEN2Δ31, rDEN3/4Δ31, rDEN4/3Δ31, (17) rDEN1Δ31, rDEN2/1Δ31, rDEN3Δ31,
 rDEN4Δ31, (18) rDEN1Δ31, rDEN2/1Δ31, rDEN3Δ31, rDEN4/1Δ31, (19)
 10 rDEN1Δ31, rDEN2/1Δ31, rDEN3Δ31, rDEN4/2Δ31, (20) rDEN1Δ31, rDEN2/1Δ31,
 rDEN3Δ31, rDEN4/3Δ31, (21) rDEN1Δ31, rDEN2/1Δ31, rDEN3/1Δ31, rDEN4Δ31,
 (22) rDEN1Δ31, rDEN2/1Δ31, rDEN3/1Δ31, rDEN4/1Δ31, (23) rDEN1Δ31,
 rDEN2/1Δ31, rDEN3/1Δ31, rDEN4/2Δ31, (24) rDEN1Δ31, rDEN2/1Δ31,
 rDEN3/1Δ31, rDEN4/3Δ31, (25) rDEN1Δ31, rDEN2/1Δ31, rDEN3/2Δ31, rDEN4Δ31,
 15 (26) rDEN1Δ31, rDEN2/1Δ31, rDEN3/2Δ31, rDEN4/1Δ31, (27) rDEN1Δ31,
 rDEN2/1Δ31, rDEN3/2Δ31, rDEN4/2Δ31, (28) rDEN1Δ31, rDEN2/1Δ31,
 rDEN3/2Δ31, rDEN4/3Δ31, (29) rDEN1Δ31, rDEN2/1Δ31, rDEN3/4Δ31, rDEN4Δ31,
 (30) rDEN1Δ31, rDEN2/1Δ31, rDEN3/4Δ31, rDEN4/1Δ31, (31) rDEN1Δ31,
 rDEN2/1Δ31, rDEN3/4Δ31, rDEN4/2Δ31, (32) rDEN1Δ31, rDEN2/1Δ31,
 20 rDEN3/4Δ31, rDEN4/3Δ31, (33) rDEN1Δ31, rDEN2/3Δ31, rDEN3Δ31, rDEN4Δ31,
 (34) rDEN1Δ31, rDEN2/3Δ31, rDEN3Δ31, rDEN4/1Δ31, (35) rDEN1Δ31,
 rDEN2/3Δ31, rDEN3Δ31, rDEN4/2Δ31, (36) rDEN1Δ31, rDEN2/3Δ31, rDEN3Δ31,
 rDEN4/3Δ31, (37) rDEN1Δ31, rDEN2/3Δ31, rDEN3/1Δ31, rDEN4Δ31, (38)
 rDEN1Δ31, rDEN2/3Δ31, rDEN3/1Δ31, rDEN4/1Δ31, (39) rDEN1Δ31, rDEN2/3Δ31,
 25 rDEN3/1Δ31, rDEN4/2Δ31, (40) rDEN1Δ31, rDEN2/3Δ31, rDEN3/1Δ31,
 rDEN4/3Δ31, (41) rDEN1Δ31, rDEN2/3Δ31, rDEN3/2Δ31, rDEN4Δ31, (42)
 rDEN1Δ31, rDEN2/3Δ31, rDEN3/2Δ31, rDEN4/1Δ31, (43) rDEN1Δ31, rDEN2/3Δ31,
 rDEN3/2Δ31, rDEN4/2Δ31, (44) rDEN1Δ31, rDEN2/3Δ31, rDEN3/2Δ31,

rDEN4/3Δ31, (45) rDEN1Δ31, rDEN2/3Δ31, rDEN3/4Δ31, rDEN4Δ31, (46)
 rDEN1Δ31, rDEN2/3Δ31, rDEN3/4Δ31, rDEN4/1Δ31, (47) rDEN1Δ31, rDEN2/3Δ31,
 rDEN3/4Δ31, rDEN4/2Δ31, (48) rDEN1Δ31, rDEN2/3Δ31, rDEN3/4Δ31,
 rDEN4/3Δ31, (49) rDEN1Δ31, rDEN2/4Δ31, rDEN3Δ31, rDEN4Δ31, (50)
 5 rDEN1Δ31, rDEN2/4Δ31, rDEN3Δ31, rDEN4/1Δ31, (51) rDEN1Δ31, rDEN2/4Δ31,
 rDEN3Δ31, rDEN4/2Δ31, (52) rDEN1Δ31, rDEN2/4Δ31, rDEN3Δ31, rDEN4/3Δ31,
 (53) rDEN1Δ31, rDEN2/4Δ31, rDEN3/1Δ31, rDEN4Δ31, (54) rDEN1Δ31,
 rDEN2/4Δ31, rDEN3/1Δ31, rDEN4/1Δ31, (55) rDEN1Δ31, rDEN2/4Δ31,
 rDEN3/1Δ31, rDEN4/2Δ31, (56) rDEN1Δ31, rDEN2/4Δ31, rDEN3/1Δ31,
 10 rDEN4/3Δ31, (57) rDEN1Δ31, rDEN2/4Δ31, rDEN3/2Δ31, rDEN4Δ31, (58)
 rDEN1Δ31, rDEN2/4Δ31, rDEN3/2Δ31, rDEN4/1Δ31, (59) rDEN1Δ31, rDEN2/4Δ31,
 rDEN3/2Δ31, rDEN4/2Δ31, (60) rDEN1Δ31, rDEN2/4Δ31, rDEN3/2Δ31,
 rDEN4/3Δ31, (61) rDEN1Δ31, rDEN2/4Δ31, rDEN3/4Δ31, rDEN4Δ31, (62)
 rDEN1Δ31, rDEN2/4Δ31, rDEN3/4Δ31, rDEN4/1Δ31, (63) rDEN1Δ31, rDEN2/4Δ31,
 15 rDEN3/4Δ31, rDEN4/2Δ31, (64) rDEN1Δ31, rDEN2/4Δ31, rDEN3/4Δ31,
 rDEN4/3Δ31, (65) rDEN1/2Δ31, rDEN2Δ31, rDEN3Δ31, rDEN4Δ31, (66)
 rDEN1/2Δ31, rDEN2Δ31, rDEN3Δ31, rDEN4/1Δ31, (67) rDEN1/2Δ31, rDEN2Δ31,
 rDEN3Δ31, rDEN4/2Δ31, (68) rDEN1/2Δ31, rDEN2Δ31, rDEN3Δ31, rDEN4/3Δ31,
 (69) rDEN1/2Δ31, rDEN2Δ31, rDEN3/1Δ31, rDEN4Δ31, (70) rDEN1/2Δ31,
 20 rDEN2Δ31, rDEN3/1Δ31, rDEN4/1Δ31, (71) rDEN1/2Δ31, rDEN2Δ31, rDEN3/1Δ31,
 rDEN4/2Δ31, (72) rDEN1/2Δ31, rDEN2Δ31, rDEN3/1Δ31, rDEN4/3Δ31, (73)
 rDEN1/2Δ31, rDEN2Δ31, rDEN3/2Δ31, rDEN4Δ31, (74) rDEN1/2Δ31, rDEN2Δ31,
 rDEN3/2Δ31, rDEN4/1Δ31, (75) rDEN1/2Δ31, rDEN2Δ31, rDEN3/2Δ31,
 rDEN4/2Δ31, (76) rDEN1/2Δ31, rDEN2Δ31, rDEN3/2Δ31, rDEN4/3Δ31, (77)
 25 rDEN1/2Δ31, rDEN2Δ31, rDEN3/4Δ31, rDEN4Δ31, (78) rDEN1/2Δ31, rDEN2Δ31,
 rDEN3/4Δ31, rDEN4/1Δ31, (79) rDEN1/2Δ31, rDEN2Δ31, rDEN3/4Δ31,
 rDEN4/2Δ31, (80) rDEN1/2Δ31, rDEN2Δ31, rDEN3/4Δ31, rDEN4/3Δ31, (81)
 rDEN1/2Δ31, rDEN2/1Δ31, rDEN3Δ31, rDEN4Δ31, (82) rDEN1/2Δ31, rDEN2/1Δ31,

rDEN3 Δ 31, rDEN4/1 Δ 31, (83) rDEN1/2 Δ 31, rDEN2/1 Δ 31, rDEN3 Δ 31, rDEN4/2 Δ 31,
 (84) rDEN1/2 Δ 31, rDEN2/1 Δ 31, rDEN3 Δ 31, rDEN4/3 Δ 31, (85) rDEN1/2 Δ 31,
 rDEN2/1 Δ 31, rDEN3/1 Δ 31, rDEN4 Δ 31, (86) rDEN1/2 Δ 31, rDEN2/1 Δ 31,
 rDEN3/1 Δ 31, rDEN4/1 Δ 31, (87) rDEN1/2 Δ 31, rDEN2/1 Δ 31, rDEN3/1 Δ 31,
 5 rDEN4/2 Δ 31, (88) rDEN1/2 Δ 31, rDEN2/1 Δ 31, rDEN3/1 Δ 31, rDEN4/3 Δ 31, (89)
 rDEN1/2 Δ 31, rDEN2/1 Δ 31, rDEN3/2 Δ 31, rDEN4 Δ 31, (90) rDEN1/2 Δ 31,
 rDEN2/1 Δ 31, rDEN3/2 Δ 31, rDEN4/1 Δ 31, (91) rDEN1/2 Δ 31, rDEN2/1 Δ 31,
 rDEN3/2 Δ 31, rDEN4/2 Δ 31, (92) rDEN1/2 Δ 31, rDEN2/1 Δ 31, rDEN3/2 Δ 31,
 rDEN4/3 Δ 31, (93) rDEN1/2 Δ 31, rDEN2/1 Δ 31, rDEN3/4 Δ 31, rDEN4 Δ 31, (94)
 10 rDEN1/2 Δ 31, rDEN2/1 Δ 31, rDEN3/4 Δ 31, rDEN4/1 Δ 31, (95) rDEN1/2 Δ 31,
 rDEN2/1 Δ 31, rDEN3/4 Δ 31, rDEN4/2 Δ 31, (96) rDEN1/2 Δ 31, rDEN2/1 Δ 31,
 rDEN3/4 Δ 31, rDEN4/3 Δ 31, (97) rDEN1/2 Δ 31, rDEN2/3 Δ 31, rDEN3 Δ 31, rDEN4 Δ 31,
 (98) rDEN1/2 Δ 31, rDEN2/3 Δ 31, rDEN3 Δ 31, rDEN4/1 Δ 31, (99) rDEN1/2 Δ 31,
 rDEN2/3 Δ 31, rDEN3 Δ 31, rDEN4/2 Δ 31, (100) rDEN1/2 Δ 31, rDEN2/3 Δ 31,
 15 rDEN3 Δ 31, rDEN4/3 Δ 31, (101) rDEN1/2 Δ 31, rDEN2/3 Δ 31, rDEN3/1 Δ 31,
 rDEN4 Δ 31, (102) rDEN1/2 Δ 31, rDEN2/3 Δ 31, rDEN3/1 Δ 31, rDEN4/1 Δ 31, (103)
 rDEN1/2 Δ 31, rDEN2/3 Δ 31, rDEN3/1 Δ 31, rDEN4/2 Δ 31, (104) rDEN1/2 Δ 31,
 rDEN2/3 Δ 31, rDEN3/1 Δ 31, rDEN4/3 Δ 31, (105) rDEN1/2 Δ 31, rDEN2/3 Δ 31,
 rDEN3/2 Δ 31, rDEN4 Δ 31, (106) rDEN1/2 Δ 31, rDEN2/3 Δ 31, rDEN3/2 Δ 31,
 20 rDEN4/1 Δ 31, (107) rDEN1/2 Δ 31, rDEN2/3 Δ 31, rDEN3/2 Δ 31, rDEN4/2 Δ 31, (108)
 rDEN1/2 Δ 31, rDEN2/3 Δ 31, rDEN3/2 Δ 31, rDEN4/3 Δ 31, (109) rDEN1/2 Δ 31,
 rDEN2/3 Δ 31, rDEN3/4 Δ 31, rDEN4 Δ 31, (110) rDEN1/2 Δ 31, rDEN2/3 Δ 31,
 rDEN3/4 Δ 31, rDEN4/1 Δ 31, (111) rDEN1/2 Δ 31, rDEN2/3 Δ 31, rDEN3/4 Δ 31,
 rDEN4/2 Δ 31, (112) rDEN1/2 Δ 31, rDEN2/3 Δ 31, rDEN3/4 Δ 31, rDEN4/3 Δ 31, (113)
 25 rDEN1/2 Δ 31, rDEN2/4 Δ 31, rDEN3 Δ 31, rDEN4 Δ 31, (114) rDEN1/2 Δ 31,
 rDEN2/4 Δ 31, rDEN3 Δ 31, rDEN4/1 Δ 31, (115) rDEN1/2 Δ 31, rDEN2/4 Δ 31,
 rDEN3 Δ 31, rDEN4/2 Δ 31, (116) rDEN1/2 Δ 31, rDEN2/4 Δ 31, rDEN3 Δ 31,
 rDEN4/3 Δ 31, (117) rDEN1/2 Δ 31, rDEN2/4 Δ 31, rDEN3/1 Δ 31, rDEN4 Δ 31, (118)

rDEN1/2Δ31, rDEN2/4Δ31, rDEN3/1Δ31, rDEN4/1Δ31, (119) rDEN1/2Δ31,
 rDEN2/4Δ31, rDEN3/1Δ31, rDEN4/2Δ31, (120) rDEN1/2Δ31, rDEN2/4Δ31,
 rDEN3/1Δ31, rDEN4/3Δ31, (121) rDEN1/2Δ31, rDEN2/4Δ31, rDEN3/2Δ31,
 rDEN4Δ31, (122) rDEN1/2Δ31, rDEN2/4Δ31, rDEN3/2Δ31, rDEN4/1Δ31, (123)
 5 rDEN1/2Δ31, rDEN2/4Δ31, rDEN3/2Δ31, rDEN4/2Δ31, (124) rDEN1/2Δ31,
 rDEN2/4Δ31, rDEN3/2Δ31, rDEN4/3Δ31, (125) rDEN1/2Δ31, rDEN2/4Δ31,
 rDEN3/4Δ31, rDEN4Δ31, (126) rDEN1/2Δ31, rDEN2/4Δ31, rDEN3/4Δ31,
 rDEN4/1Δ31, (127) rDEN1/2Δ31, rDEN2/4Δ31, rDEN3/4Δ31, rDEN4/2Δ31, (128)
 rDEN1/2Δ31, rDEN2/4Δ31, rDEN3/4Δ31, rDEN4/3Δ31, (129) rDEN1/3Δ31,
 10 rDEN2Δ31, rDEN3Δ31, rDEN4Δ31, (130) rDEN1/3Δ31, rDEN2Δ31, rDEN3Δ31,
 rDEN4/1Δ31, (131) rDEN1/3Δ31, rDEN2Δ31, rDEN3Δ31, rDEN4/2Δ31, (132)
 rDEN1/3Δ31, rDEN2Δ31, rDEN3Δ31, rDEN4/3Δ31, (133) rDEN1/3Δ31, rDEN2Δ31,
 rDEN3/1Δ31, rDEN4Δ31, (134) rDEN1/3Δ31, rDEN2Δ31, rDEN3/1Δ31,
 rDEN4/1Δ31, (135) rDEN1/3Δ31, rDEN2Δ31, rDEN3/1Δ31, rDEN4/2Δ31, (136)
 15 rDEN1/3Δ31, rDEN2Δ31, rDEN3/1Δ31, rDEN4/3Δ31, (137) rDEN1/3Δ31,
 rDEN2Δ31, rDEN3/2Δ31, rDEN4Δ31, (138) rDEN1/3Δ31, rDEN2Δ31, rDEN3/2Δ31,
 rDEN4/1Δ31, (139) rDEN1/3Δ31, rDEN2Δ31, rDEN3/2Δ31, rDEN4/2Δ31, (140)
 rDEN1/3Δ31, rDEN2Δ31, rDEN3/2Δ31, rDEN4/3Δ31, (141) rDEN1/3Δ31,
 rDEN2Δ31, rDEN3/4Δ31, rDEN4Δ31, (142) rDEN1/3Δ31, rDEN2Δ31, rDEN3/4Δ31,
 20 rDEN4/1Δ31, (143) rDEN1/3Δ31, rDEN2Δ31, rDEN3/4Δ31, rDEN4/2Δ31, (144)
 rDEN1/3Δ31, rDEN2Δ31, rDEN3/4Δ31, rDEN4/3Δ31, (145) rDEN1/3Δ31,
 rDEN2/1Δ31, rDEN3Δ31, rDEN4Δ31, (146) rDEN1/3Δ31, rDEN2/1Δ31, rDEN3Δ31,
 rDEN4/1Δ31, (147) rDEN1/3Δ31, rDEN2/1Δ31, rDEN3Δ31, rDEN4/2Δ31, (148)
 rDEN1/3Δ31, rDEN2/1Δ31, rDEN3Δ31, rDEN4/3Δ31, (149) rDEN1/3Δ31,
 25 rDEN2/1Δ31, rDEN3/1Δ31, rDEN4Δ31, (150) rDEN1/3Δ31, rDEN2/1Δ31,
 rDEN3/1Δ31, rDEN4/1Δ31, (151) rDEN1/3Δ31, rDEN2/1Δ31, rDEN3/1Δ31,
 rDEN4/2Δ31, (152) rDEN1/3Δ31, rDEN2/1Δ31, rDEN3/1Δ31, rDEN4/3Δ31, (153)
 rDEN1/3Δ31, rDEN2/1Δ31, rDEN3/2Δ31, rDEN4Δ31, (154) rDEN1/3Δ31,

rDEN2/1Δ31, rDEN3/2Δ31, rDEN4/1Δ31, (155) rDEN1/3Δ31, rDEN2/1Δ31,
 rDEN3/2Δ31, rDEN4/2Δ31, (156) rDEN1/3Δ31, rDEN2/1Δ31, rDEN3/2Δ31,
 rDEN4/3Δ31, (157) rDEN1/3Δ31, rDEN2/1Δ31, rDEN3/4Δ31, rDEN4Δ31, (158)
 rDEN1/3Δ31, rDEN2/1Δ31, rDEN3/4Δ31, rDEN4/1Δ31, (159) rDEN1/3Δ31,
 5 rDEN2/1Δ31, rDEN3/4Δ31, rDEN4/2Δ31, (160) rDEN1/3Δ31, rDEN2/1Δ31,
 rDEN3/4Δ31, rDEN4/3Δ31, (161) rDEN1/3Δ31, rDEN2/3Δ31, rDEN3Δ31,
 rDEN4Δ31, (162) rDEN1/3Δ31, rDEN2/3Δ31, rDEN3Δ31, rDEN4/1Δ31, (163)
 rDEN1/3Δ31, rDEN2/3Δ31, rDEN3Δ31, rDEN4/2Δ31, (164) rDEN1/3Δ31,
 rDEN2/3Δ31, rDEN3Δ31, rDEN4/3Δ31, (165) rDEN1/3Δ31, rDEN2/3Δ31,
 10 rDEN3/1Δ31, rDEN4Δ31, (166) rDEN1/3Δ31, rDEN2/3Δ31, rDEN3/1Δ31,
 rDEN4/1Δ31, (167) rDEN1/3Δ31, rDEN2/3Δ31, rDEN3/1Δ31, rDEN4/2Δ31, (168)
 rDEN1/3Δ31, rDEN2/3Δ31, rDEN3/1Δ31, rDEN4/3Δ31, (169) rDEN1/3Δ31,
 rDEN2/3Δ31, rDEN3/2Δ31, rDEN4Δ31, (170) rDEN1/3Δ31, rDEN2/3Δ31,
 rDEN3/2Δ31, rDEN4/1Δ31, (171) rDEN1/3Δ31, rDEN2/3Δ31, rDEN3/2Δ31,
 15 rDEN4/2Δ31, (172) rDEN1/3Δ31, rDEN2/3Δ31, rDEN3/2Δ31, rDEN4/3Δ31, (173)
 rDEN1/3Δ31, rDEN2/3Δ31, rDEN3/4Δ31, rDEN4Δ31, (174) rDEN1/3Δ31,
 rDEN2/3Δ31, rDEN3/4Δ31, rDEN4/1Δ31, (175) rDEN1/3Δ31, rDEN2/3Δ31,
 rDEN3/4Δ31, rDEN4/2Δ31, (176) rDEN1/3Δ31, rDEN2/3Δ31, rDEN3/4Δ31,
 rDEN4/3Δ31, (177) rDEN1/3Δ31, rDEN2/4Δ31, rDEN3Δ31, rDEN4Δ31, (178)
 20 rDEN1/3Δ31, rDEN2/4Δ31, rDEN3Δ31, rDEN4/1Δ31, (179) rDEN1/3Δ31,
 rDEN2/4Δ31, rDEN3Δ31, rDEN4/2Δ31, (180) rDEN1/3Δ31, rDEN2/4Δ31,
 rDEN3Δ31, rDEN4/3Δ31, (181) rDEN1/3Δ31, rDEN2/4Δ31, rDEN3/1Δ31,
 rDEN4Δ31, (182) rDEN1/3Δ31, rDEN2/4Δ31, rDEN3/1Δ31, rDEN4/1Δ31, (183)
 rDEN1/3Δ31, rDEN2/4Δ31, rDEN3/1Δ31, rDEN4/2Δ31, (184) rDEN1/3Δ31,
 25 rDEN2/4Δ31, rDEN3/1Δ31, rDEN4/3Δ31, (185) rDEN1/3Δ31, rDEN2/4Δ31,
 rDEN3/2Δ31, rDEN4Δ31, (186) rDEN1/3Δ31, rDEN2/4Δ31, rDEN3/2Δ31,
 rDEN4/1Δ31, (187) rDEN1/3Δ31, rDEN2/4Δ31, rDEN3/2Δ31, rDEN4/2Δ31, (188)
 rDEN1/3Δ31, rDEN2/4Δ31, rDEN3/2Δ31, rDEN4/3Δ31, (189) rDEN1/3Δ31,

rDEN2/4Δ31, rDEN3/4Δ31, rDEN4Δ31, (190) rDEN1/3Δ31, rDEN2/4Δ31,
 rDEN3/4Δ31, rDEN4/1Δ31, (191) rDEN1/3Δ31, rDEN2/4Δ31, rDEN3/4Δ31,
 rDEN4/2Δ31, (192) rDEN1/3Δ31, rDEN2/4Δ31, rDEN3/4Δ31, rDEN4/3Δ31, (193)
 rDEN1/4Δ31, rDEN2Δ31, rDEN3Δ31, rDEN4Δ31, (194) rDEN1/4Δ31, rDEN2Δ31,
 5 rDEN3Δ31, rDEN4/1Δ31, (195) rDEN1/4Δ31, rDEN2Δ31, rDEN3Δ31, rDEN4/2Δ31,
 (196) rDEN1/4Δ31, rDEN2Δ31, rDEN3Δ31, rDEN4/3Δ31, (197) rDEN1/4Δ31,
 rDEN2Δ31, rDEN3/1Δ31, rDEN4Δ31, (198) rDEN1/4Δ31, rDEN2Δ31, rDEN3/1Δ31,
 rDEN4/1Δ31, (199) rDEN1/4Δ31, rDEN2Δ31, rDEN3/1Δ31, rDEN4/2Δ31, (200)
 rDEN1/4Δ31, rDEN2Δ31, rDEN3/1Δ31, rDEN4/3Δ31, (201) rDEN1/4Δ31,
 10 rDEN2Δ31, rDEN3/2Δ31, rDEN4Δ31, (202) rDEN1/4Δ31, rDEN2Δ31, rDEN3/2Δ31,
 rDEN4/1Δ31, (203) rDEN1/4Δ31, rDEN2Δ31, rDEN3/2Δ31, rDEN4/2Δ31, (204)
 rDEN1/4Δ31, rDEN2Δ31, rDEN3/2Δ31, rDEN4/3Δ31, (205) rDEN1/4Δ31,
 rDEN2Δ31, rDEN3/4Δ31, rDEN4Δ31, (206) rDEN1/4Δ31, rDEN2Δ31, rDEN3/4Δ31,
 rDEN4/1Δ31, (207) rDEN1/4Δ31, rDEN2Δ31, rDEN3/4Δ31, rDEN4/2Δ31, (208)
 15 rDEN1/4Δ31, rDEN2Δ31, rDEN3/4Δ31, rDEN4/3Δ31, (209) rDEN1/4Δ31,
 rDEN2/1Δ31, rDEN3Δ31, rDEN4Δ31, (210) rDEN1/4Δ31, rDEN2/1Δ31, rDEN3Δ31,
 rDEN4/1Δ31, (211) rDEN1/4Δ31, rDEN2/1Δ31, rDEN3Δ31, rDEN4/2Δ31, (212)
 rDEN1/4Δ31, rDEN2/1Δ31, rDEN3Δ31, rDEN4/3Δ31, (213) rDEN1/4Δ31,
 rDEN2/1Δ31, rDEN3/1Δ31, rDEN4Δ31, (214) rDEN1/4Δ31, rDEN2/1Δ31,
 20 rDEN3/1Δ31, rDEN4/1Δ31, (215) rDEN1/4Δ31, rDEN2/1Δ31, rDEN3/1Δ31,
 rDEN4/2Δ31, (216) rDEN1/4Δ31, rDEN2/1Δ31, rDEN3/1Δ31, rDEN4/3Δ31, (217)
 rDEN1/4Δ31, rDEN2/1Δ31, rDEN3/2Δ31, rDEN4Δ31, (218) rDEN1/4Δ31,
 rDEN2/1Δ31, rDEN3/2Δ31, rDEN4/1Δ31, (219) rDEN1/4Δ31, rDEN2/1Δ31,
 rDEN3/2Δ31, rDEN4/2Δ31, (220) rDEN1/4Δ31, rDEN2/1Δ31, rDEN3/2Δ31,
 25 rDEN4/3Δ31, (221) rDEN1/4Δ31, rDEN2/1Δ31, rDEN3/4Δ31, rDEN4Δ31, (222)
 rDEN1/4Δ31, rDEN2/1Δ31, rDEN3/4Δ31, rDEN4/1Δ31, (223) rDEN1/4Δ31,
 rDEN2/1Δ31, rDEN3/4Δ31, rDEN4/2Δ31, (224) rDEN1/4Δ31, rDEN2/1Δ31,
 rDEN3/4Δ31, rDEN4/3Δ31, (225) rDEN1/4Δ31, rDEN2/3Δ31, rDEN3Δ31,

rDEN4Δ31, (226) rDEN1/4Δ31, rDEN2/3Δ31, rDEN3Δ31, rDEN4/1Δ31, (227)
 rDEN1/4Δ31, rDEN2/3Δ31, rDEN3Δ31, rDEN4/2Δ31, (228) rDEN1/4Δ31,
 rDEN2/3Δ31, rDEN3Δ31, rDEN4/3Δ31, (229) rDEN1/4Δ31, rDEN2/3Δ31,
 rDEN3/1Δ31, rDEN4Δ31, (230) rDEN1/4Δ31, rDEN2/3Δ31, rDEN3/1Δ31,
 5 rDEN4/1Δ31, (231) rDEN1/4Δ31, rDEN2/3Δ31, rDEN3/1Δ31, rDEN4/2Δ31, (232)
 rDEN1/4Δ31, rDEN2/3Δ31, rDEN3/1Δ31, rDEN4/3Δ31, (233) rDEN1/4Δ31,
 rDEN2/3Δ31, rDEN3/2Δ31, rDEN4Δ31, (234) rDEN1/4Δ31, rDEN2/3Δ31,
 rDEN3/2Δ31, rDEN4/1Δ31, (235) rDEN1/4Δ31, rDEN2/3Δ31, rDEN3/2Δ31,
 rDEN4/2Δ31, (236) rDEN1/4Δ31, rDEN2/3Δ31, rDEN3/2Δ31, rDEN4/3Δ31, (237)
 10 rDEN1/4Δ31, rDEN2/3Δ31, rDEN3/4Δ31, rDEN4Δ31, (238) rDEN1/4Δ31,
 rDEN2/3Δ31, rDEN3/4Δ31, rDEN4/1Δ31, (239) rDEN1/4Δ31, rDEN2/3Δ31,
 rDEN3/4Δ31, rDEN4/2Δ31, (240) rDEN1/4Δ31, rDEN2/3Δ31, rDEN3/4Δ31,
 rDEN4/3Δ31, (241) rDEN1/4Δ31, rDEN2/4Δ31, rDEN3Δ31, rDEN4Δ31, (242)
 rDEN1/4Δ31, rDEN2/4Δ31, rDEN3Δ31, rDEN4/1Δ31, (243) rDEN1/4Δ31,
 15 rDEN2/4Δ31, rDEN3Δ31, rDEN4/2Δ31, (244) rDEN1/4Δ31, rDEN2/4Δ31,
 rDEN3Δ31, rDEN4/3Δ31, (245) rDEN1/4Δ31, rDEN2/4Δ31, rDEN3/1Δ31,
 rDEN4Δ31, (246) rDEN1/4Δ31, rDEN2/4Δ31, rDEN3/1Δ31, rDEN4/1Δ31, (247)
 rDEN1/4Δ31, rDEN2/4Δ31, rDEN3/1Δ31, rDEN4/2Δ31, (248) rDEN1/4Δ31,
 rDEN2/4Δ31, rDEN3/1Δ31, rDEN4/3Δ31, (249) rDEN1/4Δ31, rDEN2/4Δ31,
 20 rDEN3/2Δ31, rDEN4Δ31, (250) rDEN1/4Δ31, rDEN2/4Δ31, rDEN3/2Δ31,
 rDEN4/1Δ31, (251) rDEN1/4Δ31, rDEN2/4Δ31, rDEN3/2Δ31, rDEN4/2Δ31, (252)
 rDEN1/4Δ31, rDEN2/4Δ31, rDEN3/2Δ31, rDEN4/3Δ31, (253) rDEN1/4Δ31,
 rDEN2/4Δ31, rDEN3/4Δ31, rDEN4Δ31, (254) rDEN1/4Δ31, rDEN2/4Δ31,
 rDEN3/4Δ31, rDEN4/1Δ31, (255) rDEN1/4Δ31, rDEN2/4Δ31, rDEN3/4Δ31,
 25 rDEN4/2Δ31, y (256) rDEN1/4Δ31, rDEN2/4Δ31, rDEN3/4Δ31, rDEN4/3Δ31. En
 otra modalidad, el quinto virus atenuado de la composición inmunogénica
 pentavalente de cualquiera de las combinaciones del primer, segundo, tercer y
 cuarto virus atenuados descritos anteriormente es una quimera de Zika de la

presente divulgación, como se describe en mayor detalle más adelante. En una modalidad, cada uno de los virus atenuados comprende la misma base de dengue. En otra modalidad, el quinto virus atenuado comprende una base de virus de dengue diferente del primer, segundo, tercero, y cuarto virus atenuados.

- 5 [0158] En una modalidad, el primer, segundo, tercero, y cuarto virus atenuados se seleccionan del grupo que consiste de: (1) rDEN1Δ30/31, rDEN2Δ30/31, rDEN3Δ30/31, rDEN4Δ30/31, (2) rDEN1Δ30/31, rDEN2Δ30/31, rDEN3Δ30/31, rDEN4/1Δ30/31, (3) rDEN1Δ30/31, rDEN2Δ30/31, rDEN3Δ30/31, rDEN4/2Δ30/31, (4) rDEN1Δ30/31, rDEN2Δ30/31, rDEN3Δ30/31, rDEN4/3Δ30/31, (5) rDEN1Δ30/31, rDEN2Δ30/31, rDEN3/1Δ30/31, rDEN4Δ30/31, (6) rDEN1Δ30/31, rDEN2Δ30/31, rDEN3/1Δ30/31, rDEN4/1Δ30/31, (7) rDEN1Δ30/31, rDEN2Δ30/31, rDEN3/1Δ30/31, rDEN4/2Δ30/31, (8) rDEN1Δ30/31, rDEN2Δ30/31, rDEN3/1Δ30/31, rDEN4/3Δ30/31, (9) rDEN1Δ30/31, rDEN2Δ30/31, rDEN3/2Δ30/31, rDEN4Δ30/31, (10) rDEN1Δ30/31, rDEN2Δ30/31, rDEN3/2Δ30/31, rDEN4/1Δ30/31, (11) rDEN1Δ30/31, rDEN2Δ30/31, rDEN3/2Δ30/31, rDEN4/2Δ30/31, (12) rDEN1Δ30/31, rDEN2Δ30/31, rDEN3/2Δ30/31, rDEN4/3Δ30/31, (13) rDEN1Δ30/31, rDEN2Δ30/31, rDEN3/4Δ30/31, rDEN4Δ30/31, (14) rDEN1Δ30/31, rDEN2Δ30/31, rDEN3/4Δ30/31, rDEN4/1Δ30/31, (15) rDEN1Δ30/31, rDEN2Δ30/31, rDEN3/4Δ30/31, rDEN4/2Δ30/31, (16) rDEN1Δ30/31, rDEN2Δ30/31, rDEN3/4Δ30/31, rDEN4/3Δ30/31, (17) rDEN1Δ30/31, rDEN2/1Δ30/31, rDEN3Δ30/31, rDEN4Δ30/31, (18) rDEN1Δ30/31, rDEN2/1Δ30/31, rDEN3Δ30/31, rDEN4/1Δ30/31, (19) rDEN1Δ30/31, rDEN2/1Δ30/31, rDEN3Δ30/31, rDEN4/2Δ30/31, (20) rDEN1Δ30/31, rDEN2/1Δ30/31, rDEN3Δ30/31, rDEN4/3Δ30/31, (21) rDEN1Δ30/31, rDEN2/1Δ30/31, rDEN3/1Δ30/31, rDEN4Δ30/31, (22) rDEN1Δ30/31, rDEN2/1Δ30/31, rDEN3/1Δ30/31, rDEN4/1Δ30/31, (23) rDEN1Δ30/31, rDEN2/1Δ30/31, rDEN3/1Δ30/31, rDEN4/2Δ30/31, (24) rDEN1Δ30/31, rDEN2/1Δ30/31, rDEN3/1Δ30/31, rDEN4/3Δ30/31, (25) rDEN1Δ30/31, rDEN2/1Δ30/31, rDEN3/2Δ30/31,

rDEN4Δ30/31, (26) rDEN1Δ30/31, rDEN2/1Δ30/31, rDEN3/2Δ30/31,
 rDEN4/1Δ30/31, (27) rDEN1Δ30/31, rDEN2/1Δ30/31, rDEN3/2Δ30/31,
 rDEN4/2Δ30/31, (28) rDEN1Δ30/31, rDEN2/1Δ30/31, rDEN3/2Δ30/31,
 rDEN4/3Δ30/31, (29) rDEN1Δ30/31, rDEN2/1Δ30/31, rDEN3/4Δ30/31,
 5 rDEN4Δ30/31, (30) rDEN1Δ30/31, rDEN2/1Δ30/31, rDEN3/4Δ30/31,
 rDEN4/1Δ30/31, (31) rDEN1Δ30/31, rDEN2/1Δ30/31, rDEN3/4Δ30/31,
 rDEN4/2Δ30/31, (32) rDEN1Δ30/31, rDEN2/1Δ30/31, rDEN3/4Δ30/31,
 rDEN4/3Δ30/31, (33) rDEN1Δ30/31, rDEN2/3Δ30/31, rDEN3Δ30/31, rDEN4Δ30/31,
 (34) rDEN1Δ30/31, rDEN2/3Δ30/31, rDEN3Δ30/31, rDEN4/1Δ30/31, (35)
 10 rDEN1Δ30/31, rDEN2/3Δ30/31, rDEN3Δ30/31, rDEN4/2Δ30/31, (36) rDEN1Δ30/31,
 rDEN2/3Δ30/31, rDEN3Δ30/31, rDEN4/3Δ30/31, (37) rDEN1Δ30/31,
 rDEN2/3Δ30/31, rDEN3/1Δ30/31, rDEN4Δ30/31, (38) rDEN1Δ30/31,
 rDEN2/3Δ30/31, rDEN3/1Δ30/31, rDEN4/1Δ30/31, (39) rDEN1Δ30/31,
 rDEN2/3Δ30/31, rDEN3/1Δ30/31, rDEN4/2Δ30/31, (40) rDEN1Δ30/31,
 15 rDEN2/3Δ30/31, rDEN3/1Δ30/31, rDEN4/3Δ30/31, (41) rDEN1Δ30/31,
 rDEN2/3Δ30/31, rDEN3/2Δ30/31, rDEN4Δ30/31, (42) rDEN1Δ30/31,
 rDEN2/3Δ30/31, rDEN3/2Δ30/31, rDEN4/1Δ30/31, (43) rDEN1Δ30/31,
 rDEN2/3Δ30/31, rDEN3/2Δ30/31, rDEN4/2Δ30/31, (44) rDEN1Δ30/31,
 rDEN2/3Δ30/31, rDEN3/2Δ30/31, rDEN4/3Δ30/31, (45) rDEN1Δ30/31,
 20 rDEN2/3Δ30/31, rDEN3/4Δ30/31, rDEN4Δ30/31, (46) rDEN1Δ30/31,
 rDEN2/3Δ30/31, rDEN3/4Δ30/31, rDEN4/1Δ30/31, (47) rDEN1Δ30/31,
 rDEN2/3Δ30/31, rDEN3/4Δ30/31, rDEN4/2Δ30/31, (48) rDEN1Δ30/31,
 rDEN2/3Δ30/31, rDEN3/4Δ30/31, rDEN4/3Δ30/31, (49) rDEN1Δ30/31,
 rDEN2/4Δ30/31, rDEN3Δ30/31, rDEN4Δ30/31, (50) rDEN1Δ30/31, rDEN2/4Δ30/31,
 25 rDEN3Δ30/31, rDEN4/1Δ30/31, (51) rDEN1Δ30/31, rDEN2/4Δ30/31, rDEN3Δ30/31,
 rDEN4/2Δ30/31, (52) rDEN1Δ30/31, rDEN2/4Δ30/31, rDEN3Δ30/31,
 rDEN4/3Δ30/31, (53) rDEN1Δ30/31, rDEN2/4Δ30/31, rDEN3/1Δ30/31,
 rDEN4Δ30/31, (54) rDEN1Δ30/31, rDEN2/4Δ30/31, rDEN3/1Δ30/31,

	rDEN4/1Δ30/31,	(55)	rDEN1Δ30/31,	rDEN2/4Δ30/31,	rDEN3/1Δ30/31,
	rDEN4/2Δ30/31,	(56)	rDEN1Δ30/31,	rDEN2/4Δ30/31,	rDEN3/1Δ30/31,
	rDEN4/3Δ30/31,	(57)	rDEN1Δ30/31,	rDEN2/4Δ30/31,	rDEN3/2Δ30/31,
	rDEN4Δ30/31,	(58)	rDEN1Δ30/31,	rDEN2/4Δ30/31,	rDEN3/2Δ30/31,
5	rDEN4/1Δ30/31,	(59)	rDEN1Δ30/31,	rDEN2/4Δ30/31,	rDEN3/2Δ30/31,
	rDEN4/2Δ30/31,	(60)	rDEN1Δ30/31,	rDEN2/4Δ30/31,	rDEN3/2Δ30/31,
	rDEN4/3Δ30/31,	(61)	rDEN1Δ30/31,	rDEN2/4Δ30/31,	rDEN3/4Δ30/31,
	rDEN4Δ30/31,	(62)	rDEN1Δ30/31,	rDEN2/4Δ30/31,	rDEN3/4Δ30/31,
	rDEN4/1Δ30/31,	(63)	rDEN1Δ30/31,	rDEN2/4Δ30/31,	rDEN3/4Δ30/31,
10	rDEN4/2Δ30/31,	(64)	rDEN1Δ30/31,	rDEN2/4Δ30/31,	rDEN3/4Δ30/31,
	rDEN4/3Δ30/31,	(65)	rDEN1/2Δ30/31,	rDEN2Δ30/31,	rDEN3Δ30/31,
		(66)	rDEN1/2Δ30/31,	rDEN2Δ30/31,	rDEN3Δ30/31,
			rDEN4/1Δ30/31,	(67)	
	rDEN1/2Δ30/31,		rDEN2Δ30/31,	rDEN3Δ30/31,	rDEN4/2Δ30/31,
					(68)
	rDEN1/2Δ30/31,		rDEN2Δ30/31,	rDEN3Δ30/31,	rDEN4/3Δ30/31,
					(69)
15	rDEN1/2Δ30/31,		rDEN2Δ30/31,	rDEN3/1Δ30/31,	rDEN4Δ30/31,
					(70)
	rDEN1/2Δ30/31,		rDEN2Δ30/31,	rDEN3/1Δ30/31,	rDEN4/1Δ30/31,
					(71)
	rDEN1/2Δ30/31,		rDEN2Δ30/31,	rDEN3/1Δ30/31,	rDEN4/2Δ30/31,
					(72)
	rDEN1/2Δ30/31,		rDEN2Δ30/31,	rDEN3/1Δ30/31,	rDEN4/3Δ30/31,
					(73)
	rDEN1/2Δ30/31,		rDEN2Δ30/31,	rDEN3/2Δ30/31,	rDEN4Δ30/31,
					(74)
20	rDEN1/2Δ30/31,		rDEN2Δ30/31,	rDEN3/2Δ30/31,	rDEN4/1Δ30/31,
					(75)
	rDEN1/2Δ30/31,		rDEN2Δ30/31,	rDEN3/2Δ30/31,	rDEN4/2Δ30/31,
					(76)
	rDEN1/2Δ30/31,		rDEN2Δ30/31,	rDEN3/2Δ30/31,	rDEN4/3Δ30/31,
					(77)
	rDEN1/2Δ30/31,		rDEN2Δ30/31,	rDEN3/4Δ30/31,	rDEN4Δ30/31,
					(78)
	rDEN1/2Δ30/31,		rDEN2Δ30/31,	rDEN3/4Δ30/31,	rDEN4/1Δ30/31,
					(79)
25	rDEN1/2Δ30/31,		rDEN2Δ30/31,	rDEN3/4Δ30/31,	rDEN4/2Δ30/31,
					(80)
	rDEN1/2Δ30/31,		rDEN2Δ30/31,	rDEN3/4Δ30/31,	rDEN4/3Δ30/31,
					(81)
	rDEN1/2Δ30/31,		rDEN2/1Δ30/31,	rDEN3Δ30/31,	rDEN4Δ30/31,
					(82)
	rDEN1/2Δ30/31,		rDEN2/1Δ30/31,	rDEN3Δ30/31,	rDEN4/1Δ30/31,
					(83)

	rDEN1/2Δ30/31,	rDEN2/1Δ30/31,	rDEN3Δ30/31,	rDEN4/2Δ30/31,	(84)
	rDEN1/2Δ30/31,	rDEN2/1Δ30/31,	rDEN3Δ30/31,	rDEN4/3Δ30/31,	(85)
	rDEN1/2Δ30/31,	rDEN2/1Δ30/31,	rDEN3/1Δ30/31,	rDEN4Δ30/31,	(86)
	rDEN1/2Δ30/31,	rDEN2/1Δ30/31,	rDEN3/1Δ30/31,	rDEN4/1Δ30/31,	(87)
5	rDEN1/2Δ30/31,	rDEN2/1Δ30/31,	rDEN3/1Δ30/31,	rDEN4/2Δ30/31,	(88)
	rDEN1/2Δ30/31,	rDEN2/1Δ30/31,	rDEN3/1Δ30/31,	rDEN4/3Δ30/31,	(89)
	rDEN1/2Δ30/31,	rDEN2/1Δ30/31,	rDEN3/2Δ30/31,	rDEN4Δ30/31,	(90)
	rDEN1/2Δ30/31,	rDEN2/1Δ30/31,	rDEN3/2Δ30/31,	rDEN4/1Δ30/31,	(91)
	rDEN1/2Δ30/31,	rDEN2/1Δ30/31,	rDEN3/2Δ30/31,	rDEN4/2Δ30/31,	(92)
10	rDEN1/2Δ30/31,	rDEN2/1Δ30/31,	rDEN3/2Δ30/31,	rDEN4/3Δ30/31,	(93)
	rDEN1/2Δ30/31,	rDEN2/1Δ30/31,	rDEN3/4Δ30/31,	rDEN4Δ30/31,	(94)
	rDEN1/2Δ30/31,	rDEN2/1Δ30/31,	rDEN3/4Δ30/31,	rDEN4/1Δ30/31,	(95)
	rDEN1/2Δ30/31,	rDEN2/1Δ30/31,	rDEN3/4Δ30/31,	rDEN4/2Δ30/31,	(96)
	rDEN1/2Δ30/31,	rDEN2/1Δ30/31,	rDEN3/4Δ30/31,	rDEN4/3Δ30/31,	(97)
15	rDEN1/2Δ30/31,	rDEN2/3Δ30/31,	rDEN3Δ30/31,	rDEN4Δ30/31,	(98)
	rDEN1/2Δ30/31,	rDEN2/3Δ30/31,	rDEN3Δ30/31,	rDEN4/1Δ30/31,	(99)
	rDEN1/2Δ30/31,	rDEN2/3Δ30/31,	rDEN3Δ30/31,	rDEN4/2Δ30/31,	(100)
	rDEN1/2Δ30/31,	rDEN2/3Δ30/31,	rDEN3Δ30/31,	rDEN4/3Δ30/31,	(101)
	rDEN1/2Δ30/31,	rDEN2/3Δ30/31,	rDEN3/1Δ30/31,	rDEN4Δ30/31,	(102)
20	rDEN1/2Δ30/31,	rDEN2/3Δ30/31,	rDEN3/1Δ30/31,	rDEN4/1Δ30/31,	(103)
	rDEN1/2Δ30/31,	rDEN2/3Δ30/31,	rDEN3/1Δ30/31,	rDEN4/2Δ30/31,	(104)
	rDEN1/2Δ30/31,	rDEN2/3Δ30/31,	rDEN3/1Δ30/31,	rDEN4/3Δ30/31,	(105)
	rDEN1/2Δ30/31,	rDEN2/3Δ30/31,	rDEN3/2Δ30/31,	rDEN4Δ30/31,	(106)
	rDEN1/2Δ30/31,	rDEN2/3Δ30/31,	rDEN3/2Δ30/31,	rDEN4/1Δ30/31,	(107)
25	rDEN1/2Δ30/31,	rDEN2/3Δ30/31,	rDEN3/2Δ30/31,	rDEN4/2Δ30/31,	(108)
	rDEN1/2Δ30/31,	rDEN2/3Δ30/31,	rDEN3/2Δ30/31,	rDEN4/3Δ30/31,	(109)
	rDEN1/2Δ30/31,	rDEN2/3Δ30/31,	rDEN3/4Δ30/31,	rDEN4Δ30/31,	(110)
	rDEN1/2Δ30/31,	rDEN2/3Δ30/31,	rDEN3/4Δ30/31,	rDEN4/1Δ30/31,	(111)

	rDEN1/2Δ30/31,	rDEN2/3Δ30/31,	rDEN3/4Δ30/31,	rDEN4/2Δ30/31,	(112)
	rDEN1/2Δ30/31,	rDEN2/3Δ30/31,	rDEN3/4Δ30/31,	rDEN4/3Δ30/31,	(113)
	rDEN1/2Δ30/31,	rDEN2/4Δ30/31,	rDEN3Δ30/31,	rDEN4Δ30/31,	(114)
	rDEN1/2Δ30/31,	rDEN2/4Δ30/31,	rDEN3Δ30/31,	rDEN4/1Δ30/31,	(115)
5	rDEN1/2Δ30/31,	rDEN2/4Δ30/31,	rDEN3Δ30/31,	rDEN4/2Δ30/31,	(116)
	rDEN1/2Δ30/31,	rDEN2/4Δ30/31,	rDEN3Δ30/31,	rDEN4/3Δ30/31,	(117)
	rDEN1/2Δ30/31,	rDEN2/4Δ30/31,	rDEN3/1Δ30/31,	rDEN4Δ30/31,	(118)
	rDEN1/2Δ30/31,	rDEN2/4Δ30/31,	rDEN3/1Δ30/31,	rDEN4/1Δ30/31,	(119)
	rDEN1/2Δ30/31,	rDEN2/4Δ30/31,	rDEN3/1Δ30/31,	rDEN4/2Δ30/31,	(120)
10	rDEN1/2Δ30/31,	rDEN2/4Δ30/31,	rDEN3/1Δ30/31,	rDEN4/3Δ30/31,	(121)
	rDEN1/2Δ30/31,	rDEN2/4Δ30/31,	rDEN3/2Δ30/31,	rDEN4Δ30/31,	(122)
	rDEN1/2Δ30/31,	rDEN2/4Δ30/31,	rDEN3/2Δ30/31,	rDEN4/1Δ30/31,	(123)
	rDEN1/2Δ30/31,	rDEN2/4Δ30/31,	rDEN3/2Δ30/31,	rDEN4/2Δ30/31,	(124)
	rDEN1/2Δ30/31,	rDEN2/4Δ30/31,	rDEN3/2Δ30/31,	rDEN4/3Δ30/31,	(125)
15	rDEN1/2Δ30/31,	rDEN2/4Δ30/31,	rDEN3/4Δ30/31,	rDEN4Δ30/31,	(126)
	rDEN1/2Δ30/31,	rDEN2/4Δ30/31,	rDEN3/4Δ30/31,	rDEN4/1Δ30/31,	(127)
	rDEN1/2Δ30/31,	rDEN2/4Δ30/31,	rDEN3/4Δ30/31,	rDEN4/2Δ30/31,	(128)
	rDEN1/2Δ30/31,	rDEN2/4Δ30/31,	rDEN3/4Δ30/31,	rDEN4/3Δ30/31,	(129)
	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2Δ30/31,	rDEN3Δ30/31,	rDEN4Δ30/31,	(130)
20	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2Δ30/31,	rDEN3Δ30/31,	rDEN4/1Δ30/31,	(131)
	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2Δ30/31,	rDEN3Δ30/31,	rDEN4/2Δ30/31,	(132)
	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2Δ30/31,	rDEN3Δ30/31,	rDEN4/3Δ30/31,	(133)
	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2Δ30/31,	rDEN3/1Δ30/31,	rDEN4Δ30/31,	(134)
	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2Δ30/31,	rDEN3/1Δ30/31,	rDEN4/1Δ30/31,	(135)
25	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2Δ30/31,	rDEN3/1Δ30/31,	rDEN4/2Δ30/31,	(136)
	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2Δ30/31,	rDEN3/1Δ30/31,	rDEN4/3Δ30/31,	(137)
	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2Δ30/31,	rDEN3/2Δ30/31,	rDEN4Δ30/31,	(138)
	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2Δ30/31,	rDEN3/2Δ30/31,	rDEN4/1Δ30/31,	(139)

	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2Δ30/31,	rDEN3/2Δ30/31,	rDEN4/2Δ30/31,	(140)
	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2Δ30/31,	rDEN3/2Δ30/31,	rDEN4/3Δ30/31,	(141)
	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2Δ30/31,	rDEN3/4Δ30/31,	rDEN4Δ30/31,	(142)
	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2Δ30/31,	rDEN3/4Δ30/31,	rDEN4/1Δ30/31,	(143)
5	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2Δ30/31,	rDEN3/4Δ30/31,	rDEN4/2Δ30/31,	(144)
	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2Δ30/31,	rDEN3/4Δ30/31,	rDEN4/3Δ30/31,	(145)
	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2/1Δ30/31,	rDEN3Δ30/31,	rDEN4Δ30/31,	(146)
	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2/1Δ30/31,	rDEN3Δ30/31,	rDEN4/1Δ30/31,	(147)
	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2/1Δ30/31,	rDEN3Δ30/31,	rDEN4/2Δ30/31,	(148)
10	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2/1Δ30/31,	rDEN3Δ30/31,	rDEN4/3Δ30/31,	(149)
	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2/1Δ30/31,	rDEN3/1Δ30/31,	rDEN4Δ30/31,	(150)
	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2/1Δ30/31,	rDEN3/1Δ30/31,	rDEN4/1Δ30/31,	(151)
	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2/1Δ30/31,	rDEN3/1Δ30/31,	rDEN4/2Δ30/31,	(152)
	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2/1Δ30/31,	rDEN3/1Δ30/31,	rDEN4/3Δ30/31,	(153)
15	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2/1Δ30/31,	rDEN3/2Δ30/31,	rDEN4Δ30/31,	(154)
	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2/1Δ30/31,	rDEN3/2Δ30/31,	rDEN4/1Δ30/31,	(155)
	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2/1Δ30/31,	rDEN3/2Δ30/31,	rDEN4/2Δ30/31,	(156)
	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2/1Δ30/31,	rDEN3/2Δ30/31,	rDEN4/3Δ30/31,	(157)
	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2/1Δ30/31,	rDEN3/4Δ30/31,	rDEN4Δ30/31,	(158)
20	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2/1Δ30/31,	rDEN3/4Δ30/31,	rDEN4/1Δ30/31,	(159)
	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2/1Δ30/31,	rDEN3/4Δ30/31,	rDEN4/2Δ30/31,	(160)
	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2/1Δ30/31,	rDEN3/4Δ30/31,	rDEN4/3Δ30/31,	(161)
	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2/3Δ30/31,	rDEN3Δ30/31,	rDEN4Δ30/31,	(162)
	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2/3Δ30/31,	rDEN3Δ30/31,	rDEN4/1Δ30/31,	(163)
25	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2/3Δ30/31,	rDEN3Δ30/31,	rDEN4/2Δ30/31,	(164)
	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2/3Δ30/31,	rDEN3Δ30/31,	rDEN4/3Δ30/31,	(165)
	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2/3Δ30/31,	rDEN3/1Δ30/31,	rDEN4Δ30/31,	(166)
	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2/3Δ30/31,	rDEN3/1Δ30/31,	rDEN4/1Δ30/31,	(167)

	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2/3Δ30/31,	rDEN3/1Δ30/31,	rDEN4/2Δ30/31,	(168)
	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2/3Δ30/31,	rDEN3/1Δ30/31,	rDEN4/3Δ30/31,	(169)
	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2/3Δ30/31,	rDEN3/2Δ30/31,	rDEN4Δ30/31,	(170)
	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2/3Δ30/31,	rDEN3/2Δ30/31,	rDEN4/1Δ30/31,	(171)
5	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2/3Δ30/31,	rDEN3/2Δ30/31,	rDEN4/2Δ30/31,	(172)
	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2/3Δ30/31,	rDEN3/2Δ30/31,	rDEN4/3Δ30/31,	(173)
	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2/3Δ30/31,	rDEN3/4Δ30/31,	rDEN4Δ30/31,	(174)
	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2/3Δ30/31,	rDEN3/4Δ30/31,	rDEN4/1Δ30/31,	(175)
	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2/3Δ30/31,	rDEN3/4Δ30/31,	rDEN4/2Δ30/31,	(176)
10	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2/3Δ30/31,	rDEN3/4Δ30/31,	rDEN4/3Δ30/31,	(177)
	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2/4Δ30/31,	rDEN3Δ30/31,	rDEN4Δ30/31,	(178)
	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2/4Δ30/31,	rDEN3Δ30/31,	rDEN4/1Δ30/31,	(179)
	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2/4Δ30/31,	rDEN3Δ30/31,	rDEN4/2Δ30/31,	(180)
	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2/4Δ30/31,	rDEN3Δ30/31,	rDEN4/3Δ30/31,	(181)
15	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2/4Δ30/31,	rDEN3/1Δ30/31,	rDEN4Δ30/31,	(182)
	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2/4Δ30/31,	rDEN3/1Δ30/31,	rDEN4/1Δ30/31,	(183)
	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2/4Δ30/31,	rDEN3/1Δ30/31,	rDEN4/2Δ30/31,	(184)
	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2/4Δ30/31,	rDEN3/1Δ30/31,	rDEN4/3Δ30/31,	(185)
	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2/4Δ30/31,	rDEN3/2Δ30/31,	rDEN4Δ30/31,	(186)
20	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2/4Δ30/31,	rDEN3/2Δ30/31,	rDEN4/1Δ30/31,	(187)
	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2/4Δ30/31,	rDEN3/2Δ30/31,	rDEN4/2Δ30/31,	(188)
	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2/4Δ30/31,	rDEN3/2Δ30/31,	rDEN4/3Δ30/31,	(189)
	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2/4Δ30/31,	rDEN3/4Δ30/31,	rDEN4Δ30/31,	(190)
	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2/4Δ30/31,	rDEN3/4Δ30/31,	rDEN4/1Δ30/31,	(191)
25	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2/4Δ30/31,	rDEN3/4Δ30/31,	rDEN4/2Δ30/31,	(192)
	rDEN1/3Δ30/31,	rDEN2/4Δ30/31,	rDEN3/4Δ30/31,	rDEN4/3Δ30/31,	(193)
	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2Δ30/31,	rDEN3Δ30/31,	rDEN4Δ30/31,	(194)
	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2Δ30/31,	rDEN3Δ30/31,	rDEN4/1Δ30/31,	(195)

	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2Δ30/31,	rDEN3Δ30/31,	rDEN4/2Δ30/31,	(196)
	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2Δ30/31,	rDEN3Δ30/31,	rDEN4/3Δ30/31,	(197)
	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2Δ30/31,	rDEN3/1Δ30/31,	rDEN4Δ30/31,	(198)
	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2Δ30/31,	rDEN3/1Δ30/31,	rDEN4/1Δ30/31,	(199)
5	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2Δ30/31,	rDEN3/1Δ30/31,	rDEN4/2Δ30/31,	(200)
	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2Δ30/31,	rDEN3/1Δ30/31,	rDEN4/3Δ30/31,	(201)
	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2Δ30/31,	rDEN3/2Δ30/31,	rDEN4Δ30/31,	(202)
	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2Δ30/31,	rDEN3/2Δ30/31,	rDEN4/1Δ30/31,	(203)
	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2Δ30/31,	rDEN3/2Δ30/31,	rDEN4/2Δ30/31,	(204)
10	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2Δ30/31,	rDEN3/2Δ30/31,	rDEN4/3Δ30/31,	(205)
	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2Δ30/31,	rDEN3/4Δ30/31,	rDEN4Δ30/31,	(206)
	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2Δ30/31,	rDEN3/4Δ30/31,	rDEN4/1Δ30/31,	(207)
	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2Δ30/31,	rDEN3/4Δ30/31,	rDEN4/2Δ30/31,	(208)
	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2Δ30/31,	rDEN3/4Δ30/31,	rDEN4/3Δ30/31,	(209)
15	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2/1Δ30/31,	rDEN3Δ30/31,	rDEN4Δ30/31,	(210)
	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2/1Δ30/31,	rDEN3Δ30/31,	rDEN4/1Δ30/31,	(211)
	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2/1Δ30/31,	rDEN3Δ30/31,	rDEN4/2Δ30/31,	(212)
	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2/1Δ30/31,	rDEN3Δ30/31,	rDEN4/3Δ30/31,	(213)
	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2/1Δ30/31,	rDEN3/1Δ30/31,	rDEN4Δ30/31,	(214)
20	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2/1Δ30/31,	rDEN3/1Δ30/31,	rDEN4/1Δ30/31,	(215)
	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2/1Δ30/31,	rDEN3/1Δ30/31,	rDEN4/2Δ30/31,	(216)
	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2/1Δ30/31,	rDEN3/1Δ30/31,	rDEN4/3Δ30/31,	(217)
	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2/1Δ30/31,	rDEN3/2Δ30/31,	rDEN4Δ30/31,	(218)
	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2/1Δ30/31,	rDEN3/2Δ30/31,	rDEN4/1Δ30/31,	(219)
25	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2/1Δ30/31,	rDEN3/2Δ30/31,	rDEN4/2Δ30/31,	(220)
	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2/1Δ30/31,	rDEN3/2Δ30/31,	rDEN4/3Δ30/31,	(221)
	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2/1Δ30/31,	rDEN3/4Δ30/31,	rDEN4Δ30/31,	(222)
	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2/1Δ30/31,	rDEN3/4Δ30/31,	rDEN4/1Δ30/31,	(223)

	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2/1Δ30/31,	rDEN3/4Δ30/31,	rDEN4/2Δ30/31,	(224)
	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2/1Δ30/31,	rDEN3/4Δ30/31,	rDEN4/3Δ30/31,	(225)
	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2/3Δ30/31,	rDEN3Δ30/31,	rDEN4Δ30/31,	(226)
	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2/3Δ30/31,	rDEN3Δ30/31,	rDEN4/1Δ30/31,	(227)
5	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2/3Δ30/31,	rDEN3Δ30/31,	rDEN4/2Δ30/31,	(228)
	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2/3Δ30/31,	rDEN3Δ30/31,	rDEN4/3Δ30/31,	(229)
	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2/3Δ30/31,	rDEN3/1Δ30/31,	rDEN4Δ30/31,	(230)
	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2/3Δ30/31,	rDEN3/1Δ30/31,	rDEN4/1Δ30/31,	(231)
	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2/3Δ30/31,	rDEN3/1Δ30/31,	rDEN4/2Δ30/31,	(232)
10	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2/3Δ30/31,	rDEN3/1Δ30/31,	rDEN4/3Δ30/31,	(233)
	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2/3Δ30/31,	rDEN3/2Δ30/31,	rDEN4Δ30/31,	(234)
	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2/3Δ30/31,	rDEN3/2Δ30/31,	rDEN4/1Δ30/31,	(235)
	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2/3Δ30/31,	rDEN3/2Δ30/31,	rDEN4/2Δ30/31,	(236)
	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2/3Δ30/31,	rDEN3/2Δ30/31,	rDEN4/3Δ30/31,	(237)
15	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2/3Δ30/31,	rDEN3/4Δ30/31,	rDEN4Δ30/31,	(238)
	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2/3Δ30/31,	rDEN3/4Δ30/31,	rDEN4/1Δ30/31,	(239)
	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2/3Δ30/31,	rDEN3/4Δ30/31,	rDEN4/2Δ30/31,	(240)
	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2/3Δ30/31,	rDEN3/4Δ30/31,	rDEN4/3Δ30/31,	(241)
	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2/4Δ30/31,	rDEN3Δ30/31,	rDEN4Δ30/31,	(242)
20	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2/4Δ30/31,	rDEN3Δ30/31,	rDEN4/1Δ30/31,	(243)
	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2/4Δ30/31,	rDEN3Δ30/31,	rDEN4/2Δ30/31,	(244)
	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2/4Δ30/31,	rDEN3Δ30/31,	rDEN4/3Δ30/31,	(245)
	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2/4Δ30/31,	rDEN3/1Δ30/31,	rDEN4Δ30/31,	(246)
	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2/4Δ30/31,	rDEN3/1Δ30/31,	rDEN4/1Δ30/31,	(247)
25	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2/4Δ30/31,	rDEN3/1Δ30/31,	rDEN4/2Δ30/31,	(248)
	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2/4Δ30/31,	rDEN3/1Δ30/31,	rDEN4/3Δ30/31,	(249)
	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2/4Δ30/31,	rDEN3/2Δ30/31,	rDEN4Δ30/31,	(250)
	rDEN1/4Δ30/31,	rDEN2/4Δ30/31,	rDEN3/2Δ30/31,	rDEN4/1Δ30/31,	(251)

rDEN1/4Δ30/31, rDEN2/4Δ30/31, rDEN3/2Δ30/31, rDEN4/2Δ30/31, (252)

rDEN1/4Δ30/31, rDEN2/4Δ30/31, rDEN3/2Δ30/31, rDEN4/3Δ30/31, (253)

rDEN1/4Δ30/31, rDEN2/4Δ30/31, rDEN3/4Δ30/31, rDEN4Δ30/31, (254)

rDEN1/4Δ30/31, rDEN2/4Δ30/31, rDEN3/4Δ30/31, rDEN4/1Δ30/31, (255)

5 rDEN1/4Δ30/31, rDEN2/4Δ30/31, rDEN3/4Δ30/31, rDEN4/2Δ30/31, y (256)

rDEN1/4Δ30/31, rDEN2/4Δ30/31, rDEN3/4Δ30/31, rDEN4/3Δ30/31. En otra

modalidad, el quinto virus atenuado de la composición inmunogénica pentavalente

de cualquiera de las combinaciones del primer, segundo, tercer y cuarto virus

atenuados descritos anteriormente es una quimera de Zika de la presente

10 divulgación, como se describió en mayor detalle anteriormente. En una modalidad,

cada uno de los virus atenuados comprende la misma base de dengue. En otra

modalidad, el quinto virus atenuado comprende una base de virus de dengue

diferente del primer, segundo, tercer, y cuarto virus atenuados.

[0159] En una modalidad, el primer, segundo, tercer, y cuarto virus atenuados se

15 seleccionan del grupo que consiste de: (1) rDEN1Δ86, rDEN2Δ86, rDEN3Δ86,

rDEN4Δ86, (2) rDEN1Δ86, rDEN2Δ86, rDEN3Δ86, rDEN4/1Δ86, (3) rDEN1Δ86,

rDEN2Δ86, rDEN3Δ86, rDEN4/2Δ86, (4) rDEN1Δ86, rDEN2Δ86, rDEN3Δ86,

rDEN4/3Δ86, (5) rDEN1Δ86, rDEN2Δ86, rDEN3/1Δ86, rDEN4Δ86, (6) rDEN1Δ86,

rDEN2Δ86, rDEN3/1Δ86, rDEN4/1Δ86, (7) rDEN1Δ86, rDEN2Δ86, rDEN3/1Δ86,

20 rDEN4/2Δ86, (8) rDEN1Δ86, rDEN2Δ86, rDEN3/1Δ86, rDEN4/3Δ86, (9) rDEN1Δ86,

rDEN2Δ86, rDEN3/2Δ86, rDEN4Δ86, (10) rDEN1Δ86, rDEN2Δ86, rDEN3/2Δ86,

rDEN4/1Δ86, (11) rDEN1Δ86, rDEN2Δ86, rDEN3/2Δ86, rDEN4/2Δ86, (12)

rDEN1Δ86, rDEN2Δ86, rDEN3/2Δ86, rDEN4/3Δ86, (13) rDEN1Δ86, rDEN2Δ86,

rDEN3/4Δ86, rDEN4Δ86, (14) rDEN1Δ86, rDEN2Δ86, rDEN3/4Δ86, rDEN4/1Δ86,

25 (15) rDEN1Δ86, rDEN2Δ86, rDEN3/4Δ86, rDEN4/2Δ86, (16) rDEN1Δ86,

rDEN2Δ86, rDEN3/4Δ86, rDEN4/3Δ86, (17) rDEN1Δ86, rDEN2/1Δ86, rDEN3Δ86,

rDEN4Δ86, (18) rDEN1Δ86, rDEN2/1Δ86, rDEN3Δ86, rDEN4/1Δ86, (19)

rDEN1Δ86, rDEN2/1Δ86, rDEN3Δ86, rDEN4/2Δ86, (20) rDEN1Δ86, rDEN2/1Δ86,

rDEN3Δ86, rDEN4/3Δ86, (21) rDEN1Δ86, rDEN2/1Δ86, rDEN3/1Δ86, rDEN4Δ86,
 (22) rDEN1Δ86, rDEN2/1Δ86, rDEN3/1Δ86, rDEN4/1Δ86, (23) rDEN1Δ86,
 rDEN2/1Δ86, rDEN3/1Δ86, rDEN4/2Δ86, (24) rDEN1Δ86, rDEN2/1Δ86,
 rDEN3/1Δ86, rDEN4/3Δ86, (25) rDEN1Δ86, rDEN2/1Δ86, rDEN3/2Δ86, rDEN4Δ86,
 5 (26) rDEN1Δ86, rDEN2/1Δ86, rDEN3/2Δ86, rDEN4/1Δ86, (27) rDEN1Δ86,
 rDEN2/1Δ86, rDEN3/2Δ86, rDEN4/2Δ86, (28) rDEN1Δ86, rDEN2/1Δ86,
 rDEN3/2Δ86, rDEN4/3Δ86, (29) rDEN1Δ86, rDEN2/1Δ86, rDEN3/4Δ86, rDEN4Δ86,
 (30) rDEN1Δ86, rDEN2/1Δ86, rDEN3/4Δ86, rDEN4/1Δ86, (31) rDEN1Δ86,
 rDEN2/1Δ86, rDEN3/4Δ86, rDEN4/2Δ86, (32) rDEN1Δ86, rDEN2/1Δ86,
 10 rDEN3/4Δ86, rDEN4/3Δ86, (33) rDEN1Δ86, rDEN2/3Δ86, rDEN3Δ86, rDEN4Δ86,
 (34) rDEN1Δ86, rDEN2/3Δ86, rDEN3Δ86, rDEN4/1Δ86, (35) rDEN1Δ86,
 rDEN2/3Δ86, rDEN3Δ86, rDEN4/2Δ86, (36) rDEN1Δ86, rDEN2/3Δ86, rDEN3Δ86,
 rDEN4/3Δ86, (37) rDEN1Δ86, rDEN2/3Δ86, rDEN3/1Δ86, rDEN4Δ86, (38)
 rDEN1Δ86, rDEN2/3Δ86, rDEN3/1Δ86, rDEN4/1Δ86, (39) rDEN1Δ86, rDEN2/3Δ86,
 15 rDEN3/1Δ86, rDEN4/2Δ86, (40) rDEN1Δ86, rDEN2/3Δ86, rDEN3/1Δ86,
 rDEN4/3Δ86, (41) rDEN1Δ86, rDEN2/3Δ86, rDEN3/2Δ86, rDEN4Δ86, (42)
 rDEN1Δ86, rDEN2/3Δ86, rDEN3/2Δ86, rDEN4/1Δ86, (43) rDEN1Δ86, rDEN2/3Δ86,
 rDEN3/2Δ86, rDEN4/2Δ86, (44) rDEN1Δ86, rDEN2/3Δ86, rDEN3/2Δ86,
 rDEN4/3Δ86, (45) rDEN1Δ86, rDEN2/3Δ86, rDEN3/4Δ86, rDEN4Δ86, (46)
 20 rDEN1Δ86, rDEN2/3Δ86, rDEN3/4Δ86, rDEN4/1Δ86, (47) rDEN1Δ86, rDEN2/3Δ86,
 rDEN3/4Δ86, rDEN4/2Δ86, (48) rDEN1Δ86, rDEN2/3Δ86, rDEN3/4Δ86,
 rDEN4/3Δ86, (49) rDEN1Δ86, rDEN2/4Δ86, rDEN3Δ86, rDEN4Δ86, (50)
 rDEN1Δ86, rDEN2/4Δ86, rDEN3Δ86, rDEN4/1Δ86, (51) rDEN1Δ86, rDEN2/4Δ86,
 rDEN3Δ86, rDEN4/2Δ86, (52) rDEN1Δ86, rDEN2/4Δ86, rDEN3Δ86, rDEN4/3Δ86,
 25 (53) rDEN1Δ86, rDEN2/4Δ86, rDEN3/1Δ86, rDEN4Δ86, (54) rDEN1Δ86,
 rDEN2/4Δ86, rDEN3/1Δ86, rDEN4/1Δ86, (55) rDEN1Δ86, rDEN2/4Δ86,
 rDEN3/1Δ86, rDEN4/2Δ86, (56) rDEN1Δ86, rDEN2/4Δ86, rDEN3/1Δ86,
 rDEN4/3Δ86, (57) rDEN1Δ86, rDEN2/4Δ86, rDEN3/2Δ86, rDEN4Δ86, (58)

rDEN1Δ86, rDEN2/4Δ86, rDEN3/2Δ86, rDEN4/1Δ86, (59) rDEN1Δ86, rDEN2/4Δ86,
 rDEN3/2Δ86, rDEN4/2Δ86, (60) rDEN1Δ86, rDEN2/4Δ86, rDEN3/2Δ86,
 rDEN4/3Δ86, (61) rDEN1Δ86, rDEN2/4Δ86, rDEN3/4Δ86, rDEN4Δ86, (62)
 rDEN1Δ86, rDEN2/4Δ86, rDEN3/4Δ86, rDEN4/1Δ86, (63) rDEN1Δ86, rDEN2/4Δ86,
 5 rDEN3/4Δ86, rDEN4/2Δ86, (64) rDEN1Δ86, rDEN2/4Δ86, rDEN3/4Δ86,
 rDEN4/3Δ86, (65) rDEN1/2Δ86, rDEN2Δ86, rDEN3Δ86, rDEN4Δ86, (66)
 rDEN1/2Δ86, rDEN2Δ86, rDEN3Δ86, rDEN4/1Δ86, (67) rDEN1/2Δ86, rDEN2Δ86,
 rDEN3Δ86, rDEN4/2Δ86, (68) rDEN1/2Δ86, rDEN2Δ86, rDEN3Δ86, rDEN4/3Δ86,
 (69) rDEN1/2Δ86, rDEN2Δ86, rDEN3/1Δ86, rDEN4Δ86, (70) rDEN1/2Δ86,
 10 rDEN2Δ86, rDEN3/1Δ86, rDEN4/1Δ86, (71) rDEN1/2Δ86, rDEN2Δ86, rDEN3/1Δ86,
 rDEN4/2Δ86, (72) rDEN1/2Δ86, rDEN2Δ86, rDEN3/1Δ86, rDEN4/3Δ86, (73)
 rDEN1/2Δ86, rDEN2Δ86, rDEN3/2Δ86, rDEN4Δ86, (74) rDEN1/2Δ86, rDEN2Δ86,
 rDEN3/2Δ86, rDEN4/1Δ86, (75) rDEN1/2Δ86, rDEN2Δ86, rDEN3/2Δ86,
 rDEN4/2Δ86, (76) rDEN1/2Δ86, rDEN2Δ86, rDEN3/2Δ86, rDEN4/3Δ86, (77)
 15 rDEN1/2Δ86, rDEN2Δ86, rDEN3/4Δ86, rDEN4Δ86, (78) rDEN1/2Δ86, rDEN2Δ86,
 rDEN3/4Δ86, rDEN4/1Δ86, (79) rDEN1/2Δ86, rDEN2Δ86, rDEN3/4Δ86,
 rDEN4/2Δ86, (80) rDEN1/2Δ86, rDEN2Δ86, rDEN3/4Δ86, rDEN4/3Δ86, (81)
 rDEN1/2Δ86, rDEN2/1Δ86, rDEN3Δ86, rDEN4Δ86, (82) rDEN1/2Δ86, rDEN2/1Δ86,
 rDEN3Δ86, rDEN4/1Δ86, (83) rDEN1/2Δ86, rDEN2/1Δ86, rDEN3Δ86, rDEN4/2Δ86,
 20 (84) rDEN1/2Δ86, rDEN2/1Δ86, rDEN3Δ86, rDEN4/3Δ86, (85) rDEN1/2Δ86,
 rDEN2/1Δ86, rDEN3/1Δ86, rDEN4Δ86, (86) rDEN1/2Δ86, rDEN2/1Δ86,
 rDEN3/1Δ86, rDEN4/1Δ86, (87) rDEN1/2Δ86, rDEN2/1Δ86, rDEN3/1Δ86,
 rDEN4/2Δ86, (88) rDEN1/2Δ86, rDEN2/1Δ86, rDEN3/1Δ86, rDEN4/3Δ86, (89)
 rDEN1/2Δ86, rDEN2/1Δ86, rDEN3/2Δ86, rDEN4Δ86, (90) rDEN1/2Δ86,
 25 rDEN2/1Δ86, rDEN3/2Δ86, rDEN4/1Δ86, (91) rDEN1/2Δ86, rDEN2/1Δ86,
 rDEN3/2Δ86, rDEN4/2Δ86, (92) rDEN1/2Δ86, rDEN2/1Δ86, rDEN3/2Δ86,
 rDEN4/3Δ86, (93) rDEN1/2Δ86, rDEN2/1Δ86, rDEN3/4Δ86, rDEN4Δ86, (94)
 rDEN1/2Δ86, rDEN2/1Δ86, rDEN3/4Δ86, rDEN4/1Δ86, (95) rDEN1/2Δ86,

rDEN2/1Δ86, rDEN3/4Δ86, rDEN4/2Δ86, (96) rDEN1/2Δ86, rDEN2/1Δ86,
 rDEN3/4Δ86, rDEN4/3Δ86, (97) rDEN1/2Δ86, rDEN2/3Δ86, rDEN3Δ86, rDEN4Δ86,
 (98) rDEN1/2Δ86, rDEN2/3Δ86, rDEN3Δ86, rDEN4/1Δ86, (99) rDEN1/2Δ86,
 rDEN2/3Δ86, rDEN3Δ86, rDEN4/2Δ86, (100) rDEN1/2Δ86, rDEN2/3Δ86,
 5 rDEN3Δ86, rDEN4/3Δ86, (101) rDEN1/2Δ86, rDEN2/3Δ86, rDEN3/1Δ86,
 rDEN4Δ86, (102) rDEN1/2Δ86, rDEN2/3Δ86, rDEN3/1Δ86, rDEN4/1Δ86, (103)
 rDEN1/2Δ86, rDEN2/3Δ86, rDEN3/1Δ86, rDEN4/2Δ86, (104) rDEN1/2Δ86,
 rDEN2/3Δ86, rDEN3/1Δ86, rDEN4/3Δ86, (105) rDEN1/2Δ86, rDEN2/3Δ86,
 rDEN3/2Δ86, rDEN4Δ86, (106) rDEN1/2Δ86, rDEN2/3Δ86, rDEN3/2Δ86,
 10 rDEN4/1Δ86, (107) rDEN1/2Δ86, rDEN2/3Δ86, rDEN3/2Δ86, rDEN4/2Δ86, (108)
 rDEN1/2Δ86, rDEN2/3Δ86, rDEN3/2Δ86, rDEN4/3Δ86, (109) rDEN1/2Δ86,
 rDEN2/3Δ86, rDEN3/4Δ86, rDEN4Δ86, (110) rDEN1/2Δ86, rDEN2/3Δ86,
 rDEN3/4Δ86, rDEN4/1Δ86, (111) rDEN1/2Δ86, rDEN2/3Δ86, rDEN3/4Δ86,
 rDEN4/2Δ86, (112) rDEN1/2Δ86, rDEN2/3Δ86, rDEN3/4Δ86, rDEN4/3Δ86, (113)
 15 rDEN1/2Δ86, rDEN2/4Δ86, rDEN3Δ86, rDEN4Δ86, (114) rDEN1/2Δ86,
 rDEN2/4Δ86, rDEN3Δ86, rDEN4/1Δ86, (115) rDEN1/2Δ86, rDEN2/4Δ86,
 rDEN3Δ86, rDEN4/2Δ86, (116) rDEN1/2Δ86, rDEN2/4Δ86, rDEN3Δ86,
 rDEN4/3Δ86, (117) rDEN1/2Δ86, rDEN2/4Δ86, rDEN3/1Δ86, rDEN4Δ86, (118)
 rDEN1/2Δ86, rDEN2/4Δ86, rDEN3/1Δ86, rDEN4/1Δ86, (119) rDEN1/2Δ86,
 20 rDEN2/4Δ86, rDEN3/1Δ86, rDEN4/2Δ86, (120) rDEN1/2Δ86, rDEN2/4Δ86,
 rDEN3/1Δ86, rDEN4/3Δ86, (121) rDEN1/2Δ86, rDEN2/4Δ86, rDEN3/2Δ86,
 rDEN4Δ86, (122) rDEN1/2Δ86, rDEN2/4Δ86, rDEN3/2Δ86, rDEN4/1Δ86, (123)
 rDEN1/2Δ86, rDEN2/4Δ86, rDEN3/2Δ86, rDEN4/2Δ86, (124) rDEN1/2Δ86,
 rDEN2/4Δ86, rDEN3/2Δ86, rDEN4/3Δ86, (125) rDEN1/2Δ86, rDEN2/4Δ86,
 25 rDEN3/4Δ86, rDEN4Δ86, (126) rDEN1/2Δ86, rDEN2/4Δ86, rDEN3/4Δ86,
 rDEN4/1Δ86, (127) rDEN1/2Δ86, rDEN2/4Δ86, rDEN3/4Δ86, rDEN4/2Δ86, (128)
 rDEN1/2Δ86, rDEN2/4Δ86, rDEN3/4Δ86, rDEN4/3Δ86, (129) rDEN1/3Δ86,
 rDEN2Δ86, rDEN3Δ86, rDEN4Δ86, (130) rDEN1/3Δ86, rDEN2Δ86, rDEN3Δ86,

rDEN4/1Δ86, (131) rDEN1/3Δ86, rDEN2Δ86, rDEN3Δ86, rDEN4/2Δ86, (132)
 rDEN1/3Δ86, rDEN2Δ86, rDEN3Δ86, rDEN4/3Δ86, (133) rDEN1/3Δ86, rDEN2Δ86,
 rDEN3/1Δ86, rDEN4Δ86, (134) rDEN1/3Δ86, rDEN2Δ86, rDEN3/1Δ86,
 rDEN4/1Δ86, (135) rDEN1/3Δ86, rDEN2Δ86, rDEN3/1Δ86, rDEN4/2Δ86, (136)
 5 rDEN1/3Δ86, rDEN2Δ86, rDEN3/1Δ86, rDEN4/3Δ86, (137) rDEN1/3Δ86,
 rDEN2Δ86, rDEN3/2Δ86, rDEN4Δ86, (138) rDEN1/3Δ86, rDEN2Δ86, rDEN3/2Δ86,
 rDEN4/1Δ86, (139) rDEN1/3Δ86, rDEN2Δ86, rDEN3/2Δ86, rDEN4/2Δ86, (140)
 rDEN1/3Δ86, rDEN2Δ86, rDEN3/2Δ86, rDEN4/3Δ86, (141) rDEN1/3Δ86,
 rDEN2Δ86, rDEN3/4Δ86, rDEN4Δ86, (142) rDEN1/3Δ86, rDEN2Δ86, rDEN3/4Δ86,
 10 rDEN4/1Δ86, (143) rDEN1/3Δ86, rDEN2Δ86, rDEN3/4Δ86, rDEN4/2Δ86, (144)
 rDEN1/3Δ86, rDEN2Δ86, rDEN3/4Δ86, rDEN4/3Δ86, (145) rDEN1/3Δ86,
 rDEN2/1Δ86, rDEN3Δ86, rDEN4Δ86, (146) rDEN1/3Δ86, rDEN2/1Δ86, rDEN3Δ86,
 rDEN4/1Δ86, (147) rDEN1/3Δ86, rDEN2/1Δ86, rDEN3Δ86, rDEN4/2Δ86, (148)
 rDEN1/3Δ86, rDEN2/1Δ86, rDEN3Δ86, rDEN4/3Δ86, (149) rDEN1/3Δ86,
 15 rDEN2/1Δ86, rDEN3/1Δ86, rDEN4Δ86, (150) rDEN1/3Δ86, rDEN2/1Δ86,
 rDEN3/1Δ86, rDEN4/1Δ86, (151) rDEN1/3Δ86, rDEN2/1Δ86, rDEN3/1Δ86,
 rDEN4/2Δ86, (152) rDEN1/3Δ86, rDEN2/1Δ86, rDEN3/1Δ86, rDEN4/3Δ86, (153)
 rDEN1/3Δ86, rDEN2/1Δ86, rDEN3/2Δ86, rDEN4Δ86, (154) rDEN1/3Δ86,
 rDEN2/1Δ86, rDEN3/2Δ86, rDEN4/1Δ86, (155) rDEN1/3Δ86, rDEN2/1Δ86,
 20 rDEN3/2Δ86, rDEN4/2Δ86, (156) rDEN1/3Δ86, rDEN2/1Δ86, rDEN3/2Δ86,
 rDEN4/3Δ86, (157) rDEN1/3Δ86, rDEN2/1Δ86, rDEN3/4Δ86, rDEN4Δ86, (158)
 rDEN1/3Δ86, rDEN2/1Δ86, rDEN3/4Δ86, rDEN4/1Δ86, (159) rDEN1/3Δ86,
 rDEN2/1Δ86, rDEN3/4Δ86, rDEN4/2Δ86, (160) rDEN1/3Δ86, rDEN2/1Δ86,
 rDEN3/4Δ86, rDEN4/3Δ86, (161) rDEN1/3Δ86, rDEN2/3Δ86, rDEN3Δ86,
 25 rDEN4Δ86, (162) rDEN1/3Δ86, rDEN2/3Δ86, rDEN3Δ86, rDEN4/1Δ86, (163)
 rDEN1/3Δ86, rDEN2/3Δ86, rDEN3Δ86, rDEN4/2Δ86, (164) rDEN1/3Δ86,
 rDEN2/3Δ86, rDEN3Δ86, rDEN4/3Δ86, (165) rDEN1/3Δ86, rDEN2/3Δ86,
 rDEN3/1Δ86, rDEN4Δ86, (166) rDEN1/3Δ86, rDEN2/3Δ86, rDEN3/1Δ86,

rDEN4/1Δ86, (167) rDEN1/3Δ86, rDEN2/3Δ86, rDEN3/1Δ86, rDEN4/2Δ86, (168)
 rDEN1/3Δ86, rDEN2/3Δ86, rDEN3/1Δ86, rDEN4/3Δ86, (169) rDEN1/3Δ86,
 rDEN2/3Δ86, rDEN3/2Δ86, rDEN4Δ86, (170) rDEN1/3Δ86, rDEN2/3Δ86,
 rDEN3/2Δ86, rDEN4/1Δ86, (171) rDEN1/3Δ86, rDEN2/3Δ86, rDEN3/2Δ86,
 5 rDEN4/2Δ86, (172) rDEN1/3Δ86, rDEN2/3Δ86, rDEN3/2Δ86, rDEN4/3Δ86, (173)
 rDEN1/3Δ86, rDEN2/3Δ86, rDEN3/4Δ86, rDEN4Δ86, (174) rDEN1/3Δ86,
 rDEN2/3Δ86, rDEN3/4Δ86, rDEN4/1Δ86, (175) rDEN1/3Δ86, rDEN2/3Δ86,
 rDEN3/4Δ86, rDEN4/2Δ86, (176) rDEN1/3Δ86, rDEN2/3Δ86, rDEN3/4Δ86,
 rDEN4/3Δ86, (177) rDEN1/3Δ86, rDEN2/4Δ86, rDEN3Δ86, rDEN4Δ86, (178)
 10 rDEN1/3Δ86, rDEN2/4Δ86, rDEN3Δ86, rDEN4/1Δ86, (179) rDEN1/3Δ86,
 rDEN2/4Δ86, rDEN3Δ86, rDEN4/2Δ86, (180) rDEN1/3Δ86, rDEN2/4Δ86,
 rDEN3Δ86, rDEN4/3Δ86, (181) rDEN1/3Δ86, rDEN2/4Δ86, rDEN3/1Δ86,
 rDEN4Δ86, (182) rDEN1/3Δ86, rDEN2/4Δ86, rDEN3/1Δ86, rDEN4/1Δ86, (183)
 rDEN1/3Δ86, rDEN2/4Δ86, rDEN3/1Δ86, rDEN4/2Δ86, (184) rDEN1/3Δ86,
 15 rDEN2/4Δ86, rDEN3/1Δ86, rDEN4/3Δ86, (185) rDEN1/3Δ86, rDEN2/4Δ86,
 rDEN3/2Δ86, rDEN4Δ86, (186) rDEN1/3Δ86, rDEN2/4Δ86, rDEN3/2Δ86,
 rDEN4/1Δ86, (187) rDEN1/3Δ86, rDEN2/4Δ86, rDEN3/2Δ86, rDEN4/2Δ86, (188)
 rDEN1/3Δ86, rDEN2/4Δ86, rDEN3/2Δ86, rDEN4/3Δ86, (189) rDEN1/3Δ86,
 rDEN2/4Δ86, rDEN3/4Δ86, rDEN4Δ86, (190) rDEN1/3Δ86, rDEN2/4Δ86,
 20 rDEN3/4Δ86, rDEN4/1Δ86, (191) rDEN1/3Δ86, rDEN2/4Δ86, rDEN3/4Δ86,
 rDEN4/2Δ86, (192) rDEN1/3Δ86, rDEN2/4Δ86, rDEN3/4Δ86, rDEN4/3Δ86, (193)
 rDEN1/4Δ86, rDEN2Δ86, rDEN3Δ86, rDEN4Δ86, (194) rDEN1/4Δ86, rDEN2Δ86,
 rDEN3Δ86, rDEN4/1Δ86, (195) rDEN1/4Δ86, rDEN2Δ86, rDEN3Δ86, rDEN4/2Δ86,
 (196) rDEN1/4Δ86, rDEN2Δ86, rDEN3Δ86, rDEN4/3Δ86, (197) rDEN1/4Δ86,
 25 rDEN2Δ86, rDEN3/1Δ86, rDEN4Δ86, (198) rDEN1/4Δ86, rDEN2Δ86, rDEN3/1Δ86,
 rDEN4/1Δ86, (199) rDEN1/4Δ86, rDEN2Δ86, rDEN3/1Δ86, rDEN4/2Δ86, (200)
 rDEN1/4Δ86, rDEN2Δ86, rDEN3/1Δ86, rDEN4/3Δ86, (201) rDEN1/4Δ86,
 rDEN2Δ86, rDEN3/2Δ86, rDEN4Δ86, (202) rDEN1/4Δ86, rDEN2Δ86, rDEN3/2Δ86,

rDEN4/1Δ86, (203) rDEN1/4Δ86, rDEN2Δ86, rDEN3/2Δ86, rDEN4/2Δ86, (204)
 rDEN1/4Δ86, rDEN2Δ86, rDEN3/2Δ86, rDEN4/3Δ86, (205) rDEN1/4Δ86,
 rDEN2Δ86, rDEN3/4Δ86, rDEN4Δ86, (206) rDEN1/4Δ86, rDEN2Δ86, rDEN3/4Δ86,
 rDEN4/1Δ86, (207) rDEN1/4Δ86, rDEN2Δ86, rDEN3/4Δ86, rDEN4/2Δ86, (208)
 5 rDEN1/4Δ86, rDEN2Δ86, rDEN3/4Δ86, rDEN4/3Δ86, (209) rDEN1/4Δ86,
 rDEN2/1Δ86, rDEN3Δ86, rDEN4Δ86, (210) rDEN1/4Δ86, rDEN2/1Δ86, rDEN3Δ86,
 rDEN4/1Δ86, (211) rDEN1/4Δ86, rDEN2/1Δ86, rDEN3Δ86, rDEN4/2Δ86, (212)
 rDEN1/4Δ86, rDEN2/1Δ86, rDEN3Δ86, rDEN4/3Δ86, (213) rDEN1/4Δ86,
 rDEN2/1Δ86, rDEN3/1Δ86, rDEN4Δ86, (214) rDEN1/4Δ86, rDEN2/1Δ86,
 10 rDEN3/1Δ86, rDEN4/1Δ86, (215) rDEN1/4Δ86, rDEN2/1Δ86, rDEN3/1Δ86,
 rDEN4/2Δ86, (216) rDEN1/4Δ86, rDEN2/1Δ86, rDEN3/1Δ86, rDEN4/3Δ86, (217)
 rDEN1/4Δ86, rDEN2/1Δ86, rDEN3/2Δ86, rDEN4Δ86, (218) rDEN1/4Δ86,
 rDEN2/1Δ86, rDEN3/2Δ86, rDEN4/1Δ86, (219) rDEN1/4Δ86, rDEN2/1Δ86,
 rDEN3/2Δ86, rDEN4/2Δ86, (220) rDEN1/4Δ86, rDEN2/1Δ86, rDEN3/2Δ86,
 15 rDEN4/3Δ86, (221) rDEN1/4Δ86, rDEN2/1Δ86, rDEN3/4Δ86, rDEN4Δ86, (222)
 rDEN1/4Δ86, rDEN2/1Δ86, rDEN3/4Δ86, rDEN4/1Δ86, (223) rDEN1/4Δ86,
 rDEN2/1Δ86, rDEN3/4Δ86, rDEN4/2Δ86, (224) rDEN1/4Δ86, rDEN2/1Δ86,
 rDEN3/4Δ86, rDEN4/3Δ86, (225) rDEN1/4Δ86, rDEN2/3Δ86, rDEN3Δ86,
 rDEN4Δ86, (226) rDEN1/4Δ86, rDEN2/3Δ86, rDEN3Δ86, rDEN4/1Δ86, (227)
 20 rDEN1/4Δ86, rDEN2/3Δ86, rDEN3Δ86, rDEN4/2Δ86, (228) rDEN1/4Δ86,
 rDEN2/3Δ86, rDEN3Δ86, rDEN4/3Δ86, (229) rDEN1/4Δ86, rDEN2/3Δ86,
 rDEN3/1Δ86, rDEN4Δ86, (230) rDEN1/4Δ86, rDEN2/3Δ86, rDEN3/1Δ86,
 rDEN4/1Δ86, (231) rDEN1/4Δ86, rDEN2/3Δ86, rDEN3/1Δ86, rDEN4/2Δ86, (232)
 rDEN1/4Δ86, rDEN2/3Δ86, rDEN3/1Δ86, rDEN4/3Δ86, (233) rDEN1/4Δ86,
 25 rDEN2/3Δ86, rDEN3/2Δ86, rDEN4Δ86, (234) rDEN1/4Δ86, rDEN2/3Δ86,
 rDEN3/2Δ86, rDEN4/1Δ86, (235) rDEN1/4Δ86, rDEN2/3Δ86, rDEN3/2Δ86,
 rDEN4/2Δ86, (236) rDEN1/4Δ86, rDEN2/3Δ86, rDEN3/2Δ86, rDEN4/3Δ86, (237)
 rDEN1/4Δ86, rDEN2/3Δ86, rDEN3/4Δ86, rDEN4Δ86, (238) rDEN1/4Δ86,

rDEN2/3Δ86, rDEN3/4Δ86, rDEN4/1Δ86, (239) rDEN1/4Δ86, rDEN2/3Δ86,
 rDEN3/4Δ86, rDEN4/2Δ86, (240) rDEN1/4Δ86, rDEN2/3Δ86, rDEN3/4Δ86,
 rDEN4/3Δ86, (241) rDEN1/4Δ86, rDEN2/4Δ86, rDEN3Δ86, rDEN4Δ86, (242)
 rDEN1/4Δ86, rDEN2/4Δ86, rDEN3Δ86, rDEN4/1Δ86, (243) rDEN1/4Δ86,
 5 rDEN2/4Δ86, rDEN3Δ86, rDEN4/2Δ86, (244) rDEN1/4Δ86, rDEN2/4Δ86,
 rDEN3Δ86, rDEN4/3Δ86, (245) rDEN1/4Δ86, rDEN2/4Δ86, rDEN3/1Δ86,
 rDEN4Δ86, (246) rDEN1/4Δ86, rDEN2/4Δ86, rDEN3/1Δ86, rDEN4/1Δ86, (247)
 rDEN1/4Δ86, rDEN2/4Δ86, rDEN3/1Δ86, rDEN4/2Δ86, (248) rDEN1/4Δ86,
 rDEN2/4Δ86, rDEN3/1Δ86, rDEN4/3Δ86, (249) rDEN1/4Δ86, rDEN2/4Δ86,
 10 rDEN3/2Δ86, rDEN4Δ86, (250) rDEN1/4Δ86, rDEN2/4Δ86, rDEN3/2Δ86,
 rDEN4/1Δ86, (251) rDEN1/4Δ86, rDEN2/4Δ86, rDEN3/2Δ86, rDEN4/2Δ86, (252)
 rDEN1/4Δ86, rDEN2/4Δ86, rDEN3/2Δ86, rDEN4/3Δ86, (253) rDEN1/4Δ86,
 rDEN2/4Δ86, rDEN3/4Δ86, rDEN4Δ86, (254) rDEN1/4Δ86, rDEN2/4Δ86,
 rDEN3/4Δ86, rDEN4/1Δ86, (255) rDEN1/4Δ86, rDEN2/4Δ86, rDEN3/4Δ86,
 15 rDEN4/2Δ86, y (256) rDEN1/4Δ86, rDEN2/4Δ86, rDEN3/4Δ86, rDEN4/3Δ86. En
 otra modalidad, el quinto virus atenuado de la composición inmunogénica
 pentavalente de cualquiera de las combinaciones del primer, segundo, tercer y
 cuarto virus atenuados descritos anteriormente es una quimera de Zika de la
 presente divulgación, como se describió en mayor detalle anteriormente. En una
 20 modalidad, cada uno de los virus atenuados comprende la misma base de dengue.
 En otra modalidad, el quinto virus atenuado comprende una base de virus de
 dengue diferente del primer, segundo, tercer, y cuarto virus atenuados.
 [0160] En otras modalidades, el primer, segundo, tercero y cuarto virus atenuados
 se seleccionan independientemente del primer, segundo, tercero y cuarto virus
 25 atenuados articulados en los párrafos [0150] a [0153], y el quinto virus atenuado es
 un ZIKV atenuado o ZIKV quimérico de la presente divulgación, como se describió
 en mayor detalle anteriormente. Por ejemplo, en una modalidad, el primer virus
 atenuado es rDEN1Δ30 (del párrafo [0148]), el segundo virus atenuado es

rDEN2/4Δ30 (del párrafo [0148]), el tercer virus atenuados es rDEN3Δ30/31 (del párrafo [0150]), y el cuarto virus atenuado es rDEN4Δ30 (del párrafo [0148]). En una modalidad, el primer virus atenuado es rDEN1Δ30, el segundo virus atenuado es rDEN2/4Δ30, el tercer virus atenuado es rDEN3Δ30/31, el cuarto virus atenuado es rDEN4Δ30, y el quinto virus atenuado es ZIKV/DEN2Δ30 o ZIKV/DEN3Δ30.

[0161] En ciertas modalidades, cada uno de los virus atenuados incluye la misma eliminación y/o mutación de atenuación. En una modalidad particular, la eliminación puede ser una eliminación en la secuencia de nucleótido de la región 3' sin traducir. Por ejemplo, la eliminación se selecciona del grupo que consiste de: una eliminación Δ30, una eliminación Δ31, una eliminación Δ30/31, y una eliminación Δ86. En otra modalidad, la mutación es en el nucleótido 4891 del gen NS3 y/o en el nucleótido 4995 del gen NS3. Se debe notar que la misma eliminación y/o mutación de atenuación utilizada en cada uno de los virus atenuados puede estar en al menos dos bases de dengue diferentes (es decir, cada uno de los virus atenuados puede tener la misma y/o diferente base de dengue que contiene el mismo tipo de eliminación y/o mutación de atenuación).

[0162] **Quimeras de Dengue Inmunogénico y Métodos para su Preparación**

[0163] Aquí se suministran quimeras de dengue inmunogénico y métodos para preparar las quimeras de dengue. Las quimeras de dengue inmunogénico son útiles con las quimeras de Zika de la presente divulgación, solas o en combinación, en un portador farmacéuticamente aceptable como composiciones inmunogénicas para minimizar, inhibir, o inmunizar individuos y animales contra infección por el virus de dengue y ZIKV.

[0164] Las quimeras de dengue comprenden secuencias de nucleótido que codifican la inmunogenicidad de un virus de dengue de un serotipo y secuencias de nucleótido adicionales seleccionadas de la base de un virus de dengue de un serotipo diferente. Estas quimeras pueden ser utilizadas para inducir una respuesta inmunogénica contra el virus de dengue.

[0165] En otra modalidad, la quimera de dengue preferida es una quimera de ácido nucleico que comprende una primera secuencia de nucleótido que codifica por lo menos una proteína estructural de un virus de dengue de un primer serotipo, y una segunda secuencia de nucleótido que codifica proteínas no estructurales de un virus de dengue de un segundo serotipo diferente del primero. En otra modalidad, el virus de dengue del segundo serotipo es DEN4. En otra modalidad, la proteína estructural puede ser la proteína C de un virus de dengue del primer serotipo, la proteína prM de un virus de dengue del primer serotipo, la proteína E de un virus de dengue del primer serotipo, o cualquier combinación de los mismos.

[0166] Además, un experto en la materia reconocerá que las sustituciones, eliminaciones o adiciones individuales en la secuencia de aminoácido, o en la secuencia de nucleótido que codifica los aminoácidos, las cuales alterna, adicionan o eliminan un aminoácido simple o un pequeño porcentaje de aminoácidos (típicamente menos de 5%, más típicamente menos de 1%) en una secuencia codificada son variaciones conservadoramente modificadas, en donde las alteraciones resultan en la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustitución conservadora que suministran aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en el estado del arte. Los siguientes seis grupos cada uno contiene aminoácidos que son sustituciones conservadoras entre sí: [0030] 1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T); [0031] 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); [0032] 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); [0033] 4) Arginina (R), Lisina (K); [0034] 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); y [0035] 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W).

[0167] Como se usa acá, los términos “quimera de dengue” y “virus de dengue quimérico” significa una construcción infecciosa de la invención que comprende secuencias de nucleótido que codifican la inmunogenicidad de un virus de dengue de un serotipo y secuencias de nucleótido adicionales derivadas de la base de un virus de dengue de un serotipo diferente.

[0168] Como se usa acá, “construcción infecciosa” indica un virus, una construcción viral, una quimera viral, un ácido nucleico derivado de un virus o cualquier porción del mismo, el cual puede ser usado para infectar una célula.

[0169] Como se usa acá, “quimera de ácido nucleico de dengue” significa una construcción de la invención que comprende ácido nucleico que comprende 5 secuencias de nucleótido que codifican la inmunogenicidad de un virus de dengue de un serotipo y secuencias de nucleótido derivadas de la base de un virus de dengue de un serotipo diferente. De forma correspondiente, cualquier virus quimérico o quimera de virus de la invención se debe reconocer como un ejemplo 10 de una quimera de ácido nucleico.

[0170] Las proteínas estructurales y no estructurales de la invención se deben entender para incluir cualquier proteína que comprende o cualquier gen que codifica la secuencia de la proteína completa, un epítipo de la proteína, o cualquier 15 fragmento que comprende, por ejemplo, tres o más residuos de aminoácido de los mismos.

[0171] **Quimeras de Dengue**

[0172] Las quimeras de dengue de la invención son construcciones formadas al fusionar genes de proteína estructural de un virus de dengue de un serotipo, por 20 ejemplo, DEN1, DEN2, DEN3, o DEN4, con genes de proteína no estructural de un virus de dengue de un serotipo diferente, por ejemplo, DEN1, DEN2, DEN3, o DEN4.

[0173] Las quimeras de dengue inmunogénico atenuado provistas acá contienen uno o más genes de proteína estructural, o porciones antigénicas del mismo, del virus de dengue de un serotipo contra la cual se confiere inmunogenicidad, y los genes de proteína no estructural de un virus de dengue de un serotipo diferente.

25 [0174] Las quimeras de dengue contienen un genoma de virus de dengue de un serotipo como la base, en la cual los genes de proteína estructural que codifica la proteína C, prM, o E del genoma de dengue, o combinaciones de los mismos, son reemplazados con los correspondientes genes de proteína estructural de un virus

de dengue de un serotipo diferente contra el que se debe proteger. La quimera de dengue viral resultante tiene las propiedades, por virtud de ser quimerizado con un virus de dengue de otro serotipo, de atenuación y por lo tanto se reduce en virulencia, pero expresa epítomos antigénicos de los productos de gen estructural y por lo tanto, es inmunogénico.

[0175] El genoma de cualquier virus de dengue puede ser usado como la base en las quimeras atenuadas (dengue y Zika) descritas acá. La base puede contener mutaciones que contribuyen al fenotipo de atenuación del virus de dengue o que facilita la replicación en el sustrato celular usado para la fabricación, por ejemplo, células Vero. Las mutaciones pueden estar la secuencia de nucleótido que codifica proteínas no estructurales, la región 5' sin traducir o la región 3' sin traducir, como se describió anteriormente con relación a la quimera de Zika. La base también puede contener mutaciones adicionales para mantener la estabilidad del fenotipo de atenuación y para reducir la posibilidad que el virus atenuado o la quimera puede devolverse al virus de tipo salvaje virulento. Por ejemplo, una primera mutación en la región 3' sin traducir y una segunda mutación en la región 5' sin traducir suministrará estabilidad de fenotipo de atenuación adicional, si se desea.

[0176] Dichas mutaciones se pueden lograr por mutagénesis dirigida al sitio usando técnicas conocidas para los expertos en la materia. Se entenderá por los expertos en la materia que los ensayos de detección de virulencia, como se describen acá y como son bien conocidos en el arte, pueden ser utilizados para distinguir entre estructuras base virulentas y atenuadas.

[0177] **Construcción de Quimeras de Dengue**

[0178] Las quimeras de virus de dengue descritas acá se pueden producir al sustituir en por lo menos uno de los genes de proteína estructural del virus de dengue de un serotipo contra el cual se desea inmunidad en una base de genoma de virus de dengue de un serotipo diferente, usando técnicas de ingeniería recombinante bien conocidas para los expertos en la materia, específicamente, removiendo un gen de

virus de dengue designado de un serotipo y reemplazándolo con el correspondiente gen deseado de virus de dengue de un serotipo diferente. Alternativamente, usando las secuencias provistas en GenBank, las moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas de dengue pueden ser sintetizadas usando técnicas conocidas de síntesis de ácido nucleico y se pueden insertar en un vector adecuado. Por lo tanto, el virus inmunogénico atenuado es producido usando técnicas de ingeniería recombinante conocidas para los expertos en la materia.

[0179] Como se mencionó anteriormente, el gen a insertar en la base codifica una proteína estructural de dengue de un serotipo. El gen de dengue de un serotipo diferente se inserta es un gen que codifica una proteína C, una proteína prM y/o una proteína E. La secuencia insertada en la base del virus de dengue puede codificar ambas proteínas estructurales prM y E del otro serotipo. La secuencia insertada en la base del virus de dengue puede codificar las proteínas estructurales c; prM, y E del otro serotipo. La base del virus de dengue es el genoma de virus DEN1, DEN2, DEN3, o DEN4, o un genoma de virus de dengue atenuado de cualquiera de estos serotipos, e incluye los genes sustituidos que codifican las proteínas estructurales C, prM y/o E de un virus de dengue de un serotipo diferente, o el gen sustituido que codifica las proteínas estructurales prM y/o E de un virus de dengue de un serotipo diferente.

[0180] Los virus quiméricos adecuados o las quimeras de ácido nucleico que contienen las secuencias de nucleótido que codifican las proteínas estructurales del virus de dengue de cualquiera de los serotipos pueden ser evaluados por utilidad como vacunas al detectarlos por marcadores fenotípicos de atenuación que indica reducción en virulencia con retención de inmunogenicidad. La antigenicidad y la inmunogenicidad se pueden evaluar usando reactividad in vitro o in vivo con anticuerpos de dengue o suero inmunorreactivo usando procedimientos de rutina de detección conocidos para los expertos en la materia.

[0181] **Vacunas de Dengue y Zika**

[0182] Los virus quiméricos de Zika y dengue preferidos y las quimeras de ácido nucleico suministran virus atenuados vivos útiles como inmunógenos o vacunas. En una modalidad preferida, las quimeras exhiben alta inmunogenicidad mientras que al mismo tiempo no producen efectos patogénicos peligrosos o letales.

5 [0183] Los virus quiméricos de dengue o las quimeras de ácido nucleico de la presente divulgación pueden comprender los genes estructurales de un virus de dengue de un serotipo en un tipo salvaje o una base de virus de dengue atenuado de un serotipo diferente, mientras que los virus quiméricos de dengue-Zika o quimeras de ácido nucleico de la presente divulgación comprenden los genes
10 estructurales de un ZIKV en una base de virus de dengue atenuado o de tipo salvaje. Por ejemplo, la quimera de dengue puede expresar los genes de proteína estructural de un virus de dengue de un serotipo en cualquiera de un virus de dengue o una base de virus de dengue atenuado de un serotipo diferente.

[0184] La estrategia descrita acá del uso de una base genética que contiene
15 regiones no estructurales de un genoma de virus de dengue de un serotipo, y, por quimerización, las propiedades de atenuación, para expresar los genes de proteína estructural de un virus de dengue de un serotipo diferente y un ZIKV ha llevado al desarrollo de candidatos de vacuna de dengue o Zika atenuado que expresan genes de proteína estructural de inmunogenicidad deseada. Así, se pueden designar los
20 candidatos de vacuna para el control de patógenos de dengue y Zika.

[0185] Los virus usados en las quimeras descritas acá son típicamente crecidos usando técnicas conocidas en el estado del arte. Las valoraciones de la placa de virus o de unidad formadora de foco (FFU) luego se realizan y se cuentan las placas o FFU con el fin de evaluar la viabilidad, valor y características fenotípicas del virus
25 crecido en el cultivo celular. Los virus de tipo salvaje son mutagenizados para derivar materiales de inicio candidatos atenuados.

[0186] Los clones infecciosos quiméricos se construyen a partir de varios serotipos de dengue. La clonación de fragmentos de cADN específicos de virus también se

puede lograr, si se desea. Los fragmentos de cADN que contienen los genes de proteína estructural o de proteína no estructural se amplifican por reacción en cadena de transcriptasa-polimerasa inversa (RT-PCR) a partir de ARN de dengue con varios cebadores. Los fragmentos amplificados son clonados en los sitios de
5 escisión de otros clones intermediarios. Los clones de dengue quimérico intermediario luego son secuenciados para verificar la secuencia del cADN específico de dengue insertado.

[0187] Los plásmidos quiméricos de genoma de longitud completa contruidos al insertar la región de gen de proteína estructural o no estructural de los virus de
10 dengue en vectores se obtienen usando técnicas recombinantes bien conocidas para los expertos en la materia.

[0188] **Método de Administración**

[0189] Las quimeras virales descritas acá se combinan individualmente o conjuntamente con un portador o vehículo farmacéuticamente aceptable para
15 administración como un inmunógeno o vacuna para humanos o animales. Los términos “portador farmacéuticamente aceptable” o “vehículo farmacéuticamente aceptable” se usan acá para significar cualquier composición o compuesto que incluye, pero no se limita a, agua o salina, un gel, ungüento, solvente, diluyente, base de ungüento fluido, liposoma, micela, micela gigante, y similares, la cual es
20 adecuada para uso en contacto con tejido vivo de animal o humano sin causar respuestas fisiológicas adversas, y la cual no interactúa con los otros componentes de la composición en una forma perjudicial.

[0190] Las formulaciones inmunogénicas o de vacuna se pueden presentar de forma conveniente en forma de dosis de unidad formadora de placa (PFU) o unidad
25 formadora de foco (FFU) y se pueden preparar usando técnicas farmacéuticas convencionales. Dichas técnicas incluyen el paso de traer en asociación el ingrediente activo y el portador farmacéutico o excipiente. En general, las formulaciones son preparadas al traer en asociación uniformemente e íntimamente

el ingrediente activo con portadores líquidos. Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones de inyección estéril acuosa y no acuosa las cuales pueden contener antioxidantes, amortiguadores, bacteriostatos y solutos que hacen la formulación isotónica con la sangre del recipiente, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones se pueden presentar en recipientes de dosis unitaria o múltiples dosis, por ejemplo, ampollitas selladas y ampollas, y se pueden almacenar en una condición liofilizada que requiere sólo la adición del portador líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones, inmediatamente antes del uso. Las soluciones y suspensiones de inyección extemporánea se pueden preparar a partir de polvos estériles, gránulos y tabletas comúnmente utilizadas por un experto en la materia.

[0191] Las formulaciones preferidas de dosis unitaria son aquellas que contienen una dosis o unidad, o una fracción adecuada de las mismas, del ingrediente administrado. Se debe entender que adicional a los ingredientes particularmente mencionados anteriormente, las formulaciones de la presente invención pueden incluir otros agentes comúnmente utilizados por un experto en la materia.

[0192] La composición inmunogénica o de vacuna puede ser administrada a través de diferentes rutas, tal como oral o parenteral, incluyendo, pero no limitado a, bucal y sublingual, rectal, aerosol, nasal, intramuscular, subcutánea, intradérmica, y tópica. La composición puede ser administrada en diferentes formas, incluyendo, pero no limitado a, soluciones, emulsiones y suspensiones, microesferas, partículas, micropartículas, nanopartículas y liposomas. Se espera que de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 dosis se pueden requerir por cronograma de inmunización. Las dosis iniciales pueden variar de aproximadamente 100 a aproximadamente 100000 PFU o FFU, con un rango de dosis preferido de aproximadamente 500 a aproximadamente 20000 PFU o FFU, un rango de dosis más preferido de aproximadamente 750 a aproximadamente 12000 PFU o FFU y

un rango de dosis aún más preferido de aproximadamente 750 a aproximadamente 4000 PFU o FFU. Las inyecciones aceleradoras pueden variar en dosis de aproximadamente 100 a aproximadamente 20000 PFU o FFU, con un rango de dosis preferido de aproximadamente 500 a aproximadamente 15000, un rango de

5 dosis más preferido de aproximadamente 500 a aproximadamente 10000 PFU o FFU, y un rango de dosis más preferido de aproximadamente 500 a aproximadamente 5000 PFU o FFU. Por ejemplo, el volumen de administración variará dependiendo de la ruta de administración. Las inyecciones intramusculares pueden variar en volumen de aproximadamente 0.1 ml a 1.0 ml.

- 10 [0193] La composición puede ser almacenada a temperaturas de aproximadamente -100°C a aproximadamente 4°C. La composición también puede ser almacenada en un estado liofilizado a diferentes temperaturas incluyendo temperatura ambiente. La composición puede ser esterilizada a través de medios convencionales conocidos para los expertos en la materia. Dichos medios incluyen, pero no se
- 15 limitan a, filtración. La composición también se puede combinar con agentes bacteriostáticos para inhibir el crecimiento de bacterias.

[0194] **Cronograma de Administración**

- [0195] La composición inmunogénica o de vacuna descrita acá puede ser administrada a humanos o animales domésticos, tal como caballos o aves,
- 20 especialmente individuos que viajan a regiones donde está presente la infección de ZIKV, y también a habitantes de esas regiones. El momento óptimo para la administración de la composición es aproximadamente uno a tres meses antes de la exposición inicial al ZIKV. Sin embargo, la composición también puede ser administrada después de la infección inicial para mejorar el progreso de la
- 25 enfermedad, o después de la infección inicial para tratar la enfermedad.

[0196] **Adyuvantes**

[0197] Una variedad de adyuvantes conocidos para los expertos en la materia pueden ser administrados en conjunto con el virus quimérico en la composición

inmunogénica o de vacuna de esta invención. Dichos adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: polímeros, copolímeros tal como copolímeros de polieoxietileno-polioxipropileno, incluyendo copolímeros de bloque, polímero p 1005, adyuvante completo de Freund (para animales), adyuvante incompleto de Freund; monooleato de sorbitán, escualeno, adyuvante CRL-8300, alumbre, QS 21, 5 dipéptido de muramilo, motivos de oligonucleótido CpG y combinaciones de motivos de oligonucleótido CpG, trehalosa, extractos bacterianos, incluyendo extractos de micobacteria, endotoxinas detoxificadas, lípidos de membrana, o combinaciones de los mismos.

10 [0198] **Secuencias de Ácido Nucleico**

[0199] Las secuencias de ácido nucleico de ZIKV y virus de dengue son útiles para designar sondas y cebadores de ácido nucleico para la detección quimeras de ZIKV y virus de dengue en una muestra o espécimen con alta sensibilidad y especificidad. Las sondas o cebadores que corresponden a ZIKV y virus de dengue pueden ser 15 usadas para detectar la presencia de un virus de vacuna. Los ácidos nucleicos y las correspondientes secuencias de aminoácido son útiles como herramientas de laboratorio para estudiar los organismos y las enfermedades y para desarrollar terapias y tratamientos para las enfermedades.

[0200] Las sondas y cebadores de ácido nucleico se hibridan selectivamente con 20 moléculas de ácido nucleico que codifican ZIKV y virus de dengue o secuencias complementarias de los mismos. Por “selectivo” o “selectivamente” se refiere a una secuencia la cual no se hibrida con otros ácidos nucleicos para prevenir la detección adecuada de la secuencia de ZIKV y la secuencia de virus de dengue. Por lo tanto, en el diseño de ácidos nucleicos de hibridación, la selectividad dependerá de los 25 otros componentes presentes en la muestra. El ácido nucleico de hibridación debe tener por lo menos 70% de complementariedad con el segmento del ácido nucleico al cual hibrida. Como se usa acá para describir ácidos nucleicos, el término “hibrida selectivamente” excluye los ácidos nucleicos de hibridación aleatoria ocasional, y

así tiene el mismo significado que “específicamente hibrida”. Las sondas y cebadores de ácido nucleico de hibridación de esta invención pueden tener por lo menos 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% y 99% de complementariedad con el segmento de la secuencia a la cual se hibrida, preferiblemente 85% o más.

5 [0201] La presente invención también contempla las secuencias, sondas y cebadores que se hibridan selectivamente al ácido nucleico de codificación o el filamento complementario, u opuesto, del ácido nucleico. La hibridación específica con ácido nucleico puede ocurrir con modificaciones o sustituciones menores en el
10 especie-especie funcional. Por “sonda” o “cebador” se refiere a las secuencias de ácido nucleico que pueden ser utilizadas como sondas o cebadores para hibridación selectiva con secuencias complementarias de ácido nucleico para su detección o amplificación, donde dichas sondas o cebadores pueden variar en longitud de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 nucleótidos, o preferiblemente de
15 aproximadamente 10 a aproximadamente 50 nucleótidos, o más preferiblemente de aproximadamente 18 a aproximadamente 24 nucleótidos. Acá se suministran ácidos nucleicos aislados que se hibridan selectivamente con los ácidos nucleicos específicos de especie bajo condiciones rigurosas y debe tener por lo menos cinco nucleótidos complementarios a la secuencia de interés como se describe en
20 Clonación Molecular: Un Manual de Laboratorio, 2ª ed, Sambrook, Fritsch y Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

[0202] Si se usa como cebador, la composición preferiblemente incluye por lo menos dos moléculas de ácido nucleico que se hibridan a regiones diferentes de la molécula objetivo con el fin de amplificar una región deseada. Dependiendo de la
25 longitud de la sonda o el cebador, la región objetivo puede variar entre 70% de bases complementarias y complementariedad completa y aún hibridarse bajo condiciones rigurosas. Por ejemplo, para el propósito de detectar la presencia de ZIKV y virus de dengue, el grado de complementariedad entre el ácido nucleico de hibridación

(sonda o cebador) y la secuencia a la cual se hibrida es al menos suficiente para distinguir la hibridación con un ácido nucleico de otros organismos.

[0203] Las secuencias de ácido nucleico que codifican ZIKV y virus de dengue se pueden insertar en un vector, tal como un plásmido, y se expresan de forma recombinante en un organismo vivo para producir péptido y polipéptidos de ZIKV recombinante y virus de dengue.

[0204] Las secuencias de ácido nucleico de la invención incluyen una sonda de diagnóstico que sirve para reportar la detección de un amplicón de cADN amplificado de la plantilla de ARN genómico viral al utilizar una reacción de cadena de transcripción/polimerasa inversa (RT-PCR), así como amplificadores delanteros y posteriores que son diseñados para amplificar el amplicón de cADN. En ciertos casos, uno de los amplificadores es diseñado para contener una mutación específica de virus de vacuna en el extremo 3'-terminal del amplificador, el cual efectivamente hace la prueba más específica para la cepa de vacuna debido a que la extensión del cebador en el sitio objetivo, y posteriormente la amplificación, ocurrirá únicamente si la plantilla de ARN viral contiene esa mutación específica.

[0205] Los sistemas automatizados de detección de secuencia de ácido nucleico a base de PCR y los ensayos TaqMan (Applied Biosystems) son ampliamente utilizados. Una estrategia desarrollada más recientemente para pruebas genéticas de diagnóstico hace uso de guías moleculares (Tyagi y Kramer 1996 Biotecnología de la Naturaleza 14:303-308). Los ensayos de guía molecular emplean tintes extintores y de reporte que difieren de aquellos utilizados en el ensayo TaqMan. Estos y otros sistemas de detección pueden ser utilizados por un experto en la materia.

[0206] **Producción de Quimera de Flavivirus**

[0207] Como se describe acá, se desarrollan vacunas de flavivirus atenuado vivo usando tecnología de ADN recombinante. Las técnicas son facilitadas por la conservación entre flavivirus de organización de genoma, número de proteínas

virales, estrategia replicativa, expresión de gen, estructura de virión y morfogénesis.

Todos los flavivirus tienen un genoma de ARN no segmentado en sentido positivo que codifica una lipoproteína larga simple que es procesada para producir proteínas estructurales de glicoproteína de cápside (C), premembrana (prM) y envoltente (E)

5 seguido por proteínas no estructurales NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, y NS5 en ese orden. Debido a estas propiedades compartidas se producen virus quiméricos viables al reemplazar los genes por las proteínas estructurales virales en un clon de cADN infeccioso de longitud completa de un flavivirus con los correspondientes genes virales (en forma de cADN) de otro flavivirus. Cuando se

10 probó, esta estrategia fue exitosa por quimeras que contenían la secuencia por proteínas estructurales virales prM y E de virus de encefalitis transmitido por garrapata (TBEV) o virus de Langat transmitido por garrapata (LGT), mientras que todas las otras secuencias fueron derivadas del cADN infeccioso de longitud completa de virus de dengue transmitido por mosquito tipo 4 (DEN4). Esto indicó

15 que las proteínas estructurales virales de un flavivirus dispar, TBEV o LGT, podría funcionar en el contexto de secuencias cis-actuación 5' y 3' y proteínas no estructurales de DEN4. Significativamente, ambas quimeras probaron ser altamente atenuadas en ratones con respecto a virulencia periférica, específicamente, la capacidad de un virus de esparcirse al CNS desde un sitio periférico de inoculación

20 y causar encefalitis. No obstante, las quimeras probaron ser inmunogénicas y capaces de inducir resistencia en ratones contra desafío con TBEV o LGT. Pareció que se logró un balance favorable entre la reducción en replicación de virus in vivo (atenuación) e inducción de inmunidad protectora. Esto se interpreta como que significa que prM y E de flavivirus transmitidos por garrapata pueden interactuar en

25 el contexto de proteínas no estructurales de DEN4 y secuencias de cis-acción 5' y 3' en un nivel suficiente para infectividad e inducción de inmunidad pero no suficiente para expresión completa de virulencia que requiere un nivel alto de replicación in vivo y capacidad de difusión en el CNS. Recientemente, se mostró

que unas quimeras de virus del oeste de Nilo y virus de dengue que contienen proteínas estructurales del virus del Oeste de Nilo y una base de virus de dengue atenuado, son efectivas como inmunógenos o vacunas. Ver Publicación de Solicitud de Patente US 2005/0100886A1, la cual se incorpora acá por referencia.

- 5 [0208] Atenuación Adicional de Quimeras de Zika/Dengue por Introducción de Mutaciones Adicionales en los Genes para las Proteínas No Estructurales de virus de Dengue que Sirven como Componente de Estos Candidatos de Vacuna. Un aumento en el nivel de atenuación de la quimera Zika/DEN o Zika/DEN-Δ30 de vacuna candidata (serotipo 1, 2, 3, o 4) se efectuó al adicionar una o más
- 10 mutaciones de atenuación al componente de dengue de las quimeras. Por ejemplo, un conjunto grande de mutaciones que atenúan DEN4 en ratones se ha identificado en la parte del genoma DEN4 incluido en los virus quiméricos WN/DEN4 descritos en la Publicación de Solicitud de Patente US 2005/0100886 A1. Los miembros de este conjunto de mutaciones de atenuación se pueden introducir en el virus
- 15 quimérico de Zika/Dengue (serotipo 1, 2, 3, o 4) para atenuar más estos virus. Puede ser necesario atenuar más el virus de Zika/DEN4. La factibilidad de este acercamiento de lograr atenuación adicional se ejemplifica al introducir una mutación viable que especifica un fenotipo sensible a la temperatura así como un fenotipo de restricción de crecimiento en el cerebro de ratón lactante en la proteína
- 20 no estructural 3 (NS3) del componente de Dengue de la quimera de Zika/Dengue. La mutación 4891 (isoleucina > treonina) se había identificado previamente en el nucleótido 4891 del gen NS3 de DEN4. La mutación 4891 especificó dos fenotipos deseables, es decir, sensibilidad a temperatura y restricción de crecimiento en tejido de cerebro. De forma similar, la mutación 4995 (serina > prolina), también en NS3,
- 25 especificó los mismos dos fenotipos deseables. Las mutaciones 4891 y 4995 también aumentan la aptitud de replicación de DEN4 en células Vero, es decir, ellas son mutaciones de adaptación de célula Vero. El residuo de aminoácido de tipo salvaje en DEN4 4891 (isoleucina) se conserva en DEN2 Tonga/74 y DEN3

Sleman/78, pero no en DEN1 Pacífico Occidental. El residuo de aminoácido de tipo salvaje en DEN4 4995 (serina) se conserva en DEN1 de Pacífico Occidental, DEN2 Tonga/74, pero no en DEN3 Sleman. Una o ambas de estas mutaciones también se puede incluir en una quimera de Zika/DEN1, 2, o 3. Así, su inclusión en el virus Zika/DEN4 se contempla como que logra un aumento en replicación de los virus en células Vero o la estabilidad genética de la mutación durante la fabricación en células Vero.

[0209] Aunque las proteínas prM y E de flavivirus de transmisión por garrapata y de transmisión por mosquito distantemente relacionados son altamente divergentes, se demostró que estas proteínas pueden intercambiarse en algunos casos sin pérdida de viabilidad de virus. Este acercamiento ha sido utilizado para crear nuevos flavivirus quiméricos.

[0210] Adicionalmente, se construyeron y se recuperaron quimeras viables transmitidas por garrapata/DEN4. En algunos casos, el flavivirus padre transmitido por garrapata fue virus de encefalitis transmitido por garrapata, un virus altamente virulento, o virus Langat, un virus transmitido por garrapata naturalmente atenuado. Así, los dos componentes de estas quimeras tuvieron huéspedes de vector dispares, específicamente garrapatas, y en el caso de DEN4, mosquitos. Se consideró que la eficiencia disminuida de las interacciones de producto de gen en las quimeras es la base para la atenuación marcada exhibida por estos virus híbridos. No obstante, aunque se atenuó altamente en ratones, las quimeras de TBEV/DEN4 y LGT/DEN4 fueron inmunogénicas y suministran protección considerable contra su flavivirus padre transmitido por garrapata.

[0211] También se construyeron quimeras WN/DEN4 que contenían un genoma DEN4 cuyos genes para proteínas estructurales prM y E fueron reemplazadas por los correspondientes genes de la cepa WN NY99. Publicación de Solicitud de Patente US 2005/0100886 A1. Los virus padre de las quimeras WN/DEN4 son transmitidas por mosquitos. Sin embargo, la preferencia de vector difiere, Aedes

para DEN4 y Culex para WN. Aunque es altamente atenuado, las quimeras WN/DEN4 estimularon un nivel moderado a alto de anticuerpos de neutralización de suero contra WN NY99. Hubo una fuerte correlación entre el nivel de anticuerpos de neutralización a WN inducido por inmunización y resistencia a desafío posterior de WN letal.

[0212] **EJEMPLOS**

[0213] **Construcción de un ZIKV Atenuado.** Se construyó un ZIKV atenuado que contiene la mutación $\Delta 30$ (rZIKV $\Delta 30$) o un ZIKV que contiene el 3'UTR de rDEN4 $\Delta 30$ (rZIKV-3'D4 $\Delta 30$).

10 [0214] **Construcción de un ZIKV Quimérico Atenuado.** Se construyó un ZIKV atenuado al introducir prM y E de ZIKV en DEN2 $\Delta 30$, como se muestra en la Figura 11. El nuevo virus quimérico se denominaría rZIKV/D2 $\Delta 30$. De forma similar, prM y E de ZIKV se pueden introducir en DEN3 $\Delta 30$.

[0215] **Fabricación de una Vacuna Multivalente.** Se construyó una vacuna multivalente al combinar virus atenuados, tal como rDEN1 $\Delta 30$, rDEN2/4 $\Delta 30$, rDEN3 $\Delta 30$ /31, rDEN4 $\Delta 30$, y rZIKV/D2 $\Delta 30$.

[0216] **Desarrollo de Vacuna DENV-ZIKV Pentavalente.** Los plásmidos de cADN quimérico ilustrados en la Figura 12 reemplazan las regiones de gen prM y E de DEN2 $\Delta 30$ o DEN4 $\Delta 30$ con aquellos derivados de ZIKV-Paraíba/2015 (Brasil). Para estabilidad en E. coli, se determinó que el marco de lectura abierta viral tuvo que ser interrumpido mediante la inserción de secuencias de intrones, lo cual se muestra en mayor detalle en las Figuras 14A-14C y como se discute más adelante. Para virus infecciosos de recuperación, las células Vero fueron transfectadas con el plásmido de caDN. La transcripción procede desde la secuencia promotora de CMV y se termina por secuencias de ribosoma (RBZ) y terminadora (TERM) para crear el genoma de virus. La secuencia de intrón se remueve mediante el proceso de empalme de ARN normal. Los mapas de plásmidos para las bases DENV-2 y DENV-4 se muestran en las Figuras 13A y 13B.

[0217] Como se discutió anteriormente, se requirió que las secuencias de intrón estabilicen las construcciones DENV-ZIKV. La misma secuencia de intrón estándar fue utilizada para cada construcción de cADN. ZV-D2 contiene una inserción simple en el codón de alanina 149 en la región de gen NS1 (Figura 14A). ZV-D4 contiene dos inserciones de intrón ubicadas en el codón de alanina 148 en ND2A (Figura 14B) y el codón de alanina 425 de NS5 (Figura 14C).

[0218] **Evaluación de cinética de replicación y título pico de virus quiméricos DENV-ZIKV en células de cultivo de tejido.**

Se produjeron virus quiméricos rZIKV/D2Δ30-710 (base de DEN2Δ30) y rZIKV/D4Δ30-713 (base de DEN4Δ30) y se recuperaron de células Vero, clonadas biológicamente mediante dos rondas de dilución terminal en células Vero y luego se amplificaron al pasarse en células Vero para generar existencias de semilla de trabajo. Se evaluó la cinética de crecimiento de virus en dos diferentes multiplicidades de infección (MOI). Como se muestra en la Figura 15A, ambos virus se replican a más de $6 \log_{10}$ PFU/mL con títulos con pico en aproximadamente el día 5. Para ambos virus, un MOI de 0.01 suministró mayores rendimientos (Figura 15B). Ambos virus se consideraron adecuados para evaluación y fabricación posterior.

[0219] El nivel de atenuación es probablemente ligeramente diferente para las dos bases. La examinación de la atenuación será determinada por estudios en primates no humanos y evaluación de Fase I en sujetos humanos. La selección a un candidato de vacuna final se basará en la seguridad, infectividad, e inmunogenicidad en sujetos humanos.

[0220] **Evaluación de la Atenuación de Virus Quiméricos DENV-ZIKV.** Se evaluó la atenuación de los candidatos de vacuna por medio de estudios en primates no humanos, donde la replicación del virus y la inmunogenicidad de los candidatos de vacuna se comparó con el ZIKV de tipo salvaje. Los monos Rhesus fueron inoculados subcutáneamente con 10^4 pfu ($4.0 \log_{10}$ PFU) de virus de tipo salvaje (ZIKV-SJRP/2016, ZIKV-Nicaragua/2016, o ZIKV-Paraíba/2015) o candidatos de

vacuna de ZIKV quimérico (rZIKVD2Δ30-710 o rZIKVD4Δ30-713). El suero fue recolectado diariamente de 2 a 8 días después de la inoculación. El suero recolectado fue ensayado en células Vero para virus infeccioso. La Tabla 1 a continuación muestra los resultados de la evaluación de viremia, y la Tabla 2 muestra los picos medio de la evaluación de viremia.

[0221] El ZIKV de tipo salvaje se replicó a títulos de aproximadamente 2 log₁₀PFU/mL por 3 – 4 días. La replicación de los candidatos de vacuna quimérica estuvo por debajo del nivel de detección (<0.7 log₁₀PFU/mL), confirmando de esta forma su fenotipo atenuado en comparación con el ZIKV de tipo salvaje. La atenuación detectada es probable debido a la quimerización y la presencia de la mutación Δ30.

Tabla 1. Título de viremia en monos Rhesus inoculados con candidatos de vacuna de ZIKV de tipo salvaje o ZIKV quimérico.

Virus	ID de mono	Título de Viremia – log ₁₀ PFU/mL						Pico medio
		Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Pico	
ZIKV-SRJP	DFWV	<0.7	1.5	<0.7	1.0	<0.7	1.5	1.8
	DF5A	1.5	1.8	1.7	<0.7	<0.7	1.8	
	DF3Z	0.7	1.8	1.8	0.7	<0.7	1.8	
	0FA	1.5	1.3	1.9	0.7	<0.7	1.9	
ZIKV-Nicaragua	DF0B	2.2	2.5	1.5	<0.7	<0.7	2.5	2.3
	DF2H	1.8	2.2	1.7	<0.7	<0.7	2.2	
	DFWF	1.7	2.3	2.3	1.0	<0.7	2.3	
	DFWL	1.7	2.1	1.9	<0.7	<0.7	2.1	
ZIKV-Paraíba	DFWW	<0.7	1.5	1.8	1.3	<0.7	1.8	2.1
	06Z	2.4	2.6	1.8	<0.7	<0.7	2.6	
	06J	1.9	2.0	1.4	<0.7	<0.7	2.0	

	DFXA	0.7	1.8	2.0	<0.7	<0.7	2.0	
	0FD	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	
rZIKVD2Δ30	06R	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7
	DF1N	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	
	DF0X	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	
	DFZH	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	
rZIKVD4Δ30	DFWM	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7
	047	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	
	062	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	

Tabla 2. Título medio de candidatos de vacuna de ZIKV tipo salvaje y ZIKV quimérico

Título medio (por día)	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6
ZIKV-SJRP	1.2	1.6	1.8	0.8	<0.7
ZIKV-Nicaragua	1.9	2.3	1.9	1.0	<0.7
ZIKV-Paraíba	1.7	2.0	1.8	1.3	<0.7
rZIVKD2Δ30	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7
rZIKVD4Δ30	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7

5 [0222] **MODALIDADES ESPECÍFICAS**

[0223] De acuerdo con una modalidad específica, la presente divulgación suministra una quimera de ácido nucleico de Zika que comprende: una primera secuencia de nucleótido que codifica por lo menos una proteína estructural de un virus de Zika (ZIKV), una segunda secuencia de nucleótido que codifica por lo menos una
 10 proteína no estructural de un primer flavivirus, y una tercera secuencia de nucleótido de una región 3' sin traducir de un segundo flavivirus.

[0224] En cualquier aspecto o modalidad descrita acá, el primer flavivirus es un virus de dengue.

[0225] En cualquier aspecto o modalidad descrita acá, el primer flavivirus es un ZIKV.

[0226] En cualquier aspecto o modalidad descrita acá, el segundo flavivirus es un virus de dengue.

5 [0227] En cualquier aspecto o modalidad descrita acá, el segundo flavivirus es un ZIKV.

[0228] En cualquier aspecto o modalidad descrita acá, el virus de dengue es un dengue de serotipo 1.

10 [0229] En cualquier aspecto o modalidad descrita acá, el virus de dengue es un dengue de serotipo 2.

[0230] En cualquier aspecto o modalidad descrita acá, el virus de dengue es un dengue de serotipo 3.

[0231] En cualquier aspecto o modalidad descrita acá, el virus de dengue es un dengue de serotipo 4.

15 [0232] En cualquier aspecto o modalidad descrita acá, la región 3' sin traducir contiene una eliminación en la secuencia de nucleótido.

[0233] En cualquier aspecto o modalidad descrita acá, la eliminación se selecciona del grupo que consiste de: una eliminación $\Delta 30$, una eliminación $\Delta 31$, una eliminación $\Delta 30/31$, y una eliminación $\Delta 86$.

20 [0234] En cualquier aspecto o modalidad descrita acá, la quimera de ácido nucleico de Zika además comprende una mutación en el nucleótido 4891 del gen NS3 y/o en el nucleótido 4995 del gen NS3.

[0235] En cualquier aspecto o modalidad descrita acá, la por lo menos una proteína estructural es pre-membrana (prM9, envoltente (E), o ambas.

25 [0236] De acuerdo con un aspecto adicional, la presente divulgación suministra una composición inmunogénica pentavalente que comprende: un primer virus atenuado que es inmunogénico contra dengue de serotipo 1, un segundo virus atenuado que es inmunogénico contra dengue de serotipo 2, un tercer virus atenuado que es

inmunogénico contra dengue de serotipo 3, un cuarto virus atenuado que es inmunogénico contra dengue de serotipo 4, y un quinto virus atenuado que es inmunogénico contra ZIKV.

5 [0237] En cualquier aspecto o modalidad descrita acá, el quinto virus atenuado es la quima de ácido nucleico de Zika de la presente divulgación.

[0238] En cualquier aspecto o modalidad descrita acá, cada uno de los virus atenuados incluye la misma eliminación o mutación de atenuación.

[0239] En cualquier aspecto o modalidad descrita acá, la eliminación es una eliminación en la secuencia de nucleótido de la región 3' sin trasladar.

10 [0240] En cualquier aspecto o modalidad descrita acá, la eliminación se selecciona del grupo que consiste de: una eliminación $\Delta 30$, una eliminación $\Delta 31$, una eliminación $\Delta 30/31$, y una eliminación $\Delta 86$.

[0241] En cualquier aspecto o modalidad descrita acá, en donde la composición inmunogénica pentavalente que además comprende una mutación está en el
15 nucleótido 4891 del gen NS3 y/o en el nucleótido 4995 del gen NS3.

[0242] En cualquier aspecto o modalidad descrita acá, donde la composición inmunogénica pentavalente de la presente divulgación además comprende un adyuvante.

[0243] De acuerdo con un aspecto adicional, la presente divulgación suministra una
20 composición inmunogénica multivalente que comprende: por lo menos un primer virus atenuado que es inmunogénico contra un flavivirus, y un segundo virus atenuado que es inmunogénico contra ZIKV.

[0244] En cualquier aspecto o modalidad descrita acá, el flavivirus es por lo menos uno de virus de dengue serotipo 1, virus de dengue serotipo 2, virus de dengue
25 serotipo 3, virus de dengue serotipo 4, virus de Nilo Occidental, virus de fiebre amarilla, varis de encefalitis Japonesa, y virus de encefalitis transmitida por garrapatas, o una combinación de los mismos.

[0245] En cualquier aspecto o modalidad descrita acá, el segundo virus atenuado es una quimera de ácido nucleico de zika de la presente divulgación.

[0246] En cualquier aspecto o modalidad descrita acá, el segundo virus atenuado es un ZIKV que comprende una o más mutaciones de atenuación y/o eliminaciones en el genoma.

[0247] De acuerdo con otro aspecto, la presente divulgación suministra un método para inducir una respuesta inmune en un sujeto. El método comprende administrar una cantidad efectiva de la composición de la presente divulgación.

[0248] De acuerdo con otro aspecto adicional, la presente invención suministra un método para prevenir o tratar una infección de ZIKV en un sujeto. El método comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de la quimera de ácido nucleico de Zika de la presente divulgación o una cantidad efectiva de la composición inmunogénica de la presente divulgación.

[0249] Aunque la presente invención ha sido descrita en algún detalle para propósitos de claridad y entendimiento, un experto en la materia apreciará que varios cambios en la forma y detalle se pueden hacer sin salirse del verdadero alcance de la invención. Todas las figuras, tablas, apéndices, patentes, solicitudes de patente y publicaciones, referenciadas anteriormente, se incorporan acá por referencia.

Referencias

1. Bhamarapavati, N. y Sutee, Y. 2000 Vacuna 18:44-7
2. Blaney, y otros, 2001 J Virol 75:9731-9740;
3. Blaney, y otros, 2002 Virología 300: 125-139;
4. Blaney y otros, Vacuna (2008) 26, 817—828).
5. Blaney y otros, BMC Enfermedades Infecciosas 2004, 4:39.
6. Bray, M., Men, R. & Lai, C.-J. 1996 J. Virol. 70:4162-4166;

7. Burke, D. S. & Monath, T. P. 2001 in Virología de Campo, eds. Knipe, D. M. & Howley, P. M. Lippincott Williams y Wilkins, Filadelfia, 4ª ed., pp. 1043-1125;
- Hayes, C. G. 1989 en Los Arbovirus: Epidemiología y Ecología, ed. Monath T. P. Boca Ratón, F. L.: CRC Prensa, Volumen V, pp. 59-88
- 5 8. Caufour, P. S. y otros, 2001 Virus Res 79:1-14
9. Chambers, T. J. y otros, 1999 J Virol 73:3095-3101;
- 10.M. Chastain, "Instituto Nacional de Salud: el Virus de Zika es una 'Pandemia'", 30 de Enero de 2016, Breitbart fuente de noticias en línea, <http://www.breitbart.com/national-security/2016/01/30/zika-virus-reaches-pandemic-levels>.
- 10 11. Durbin y otros, 2001 Am J Trop Med 65:405-413
12. Guillot, S. y otros, 2000 J Virol 74:8434-43
13. Guirakhoo, F. y otros, 2000 J Virol 74:5477-5485;
14. Hanley, y otros, 2002 J Virol 76:525-31
- 15 15. Huang, C. Y. y otros, 2000 J Virol 74:3020-3028;
16. Lindenbach, B. D. & Rice, C. M. 2001 en: Virología de Campo, eds. Knipe, D. M. & Howley, P. M. Lippincott Williams y Wilkins, Filadelfia, 4ª ed., pp. 1043- 1125
17. Men y otros, 1996 J Virol 70:3930-3937;
18. Oster y otros, "Guía Provisional para Prevención de Transmisión Sexual de Virus de Zika – Estados Unidos, 2016", Reporte Semanal de Morbilidad y Mortalidad 2016; 65; 1-2
- 20 19. Pletnev, A. G., Bray, M. & Lai, C.-J. 1993 J Virol 67:4956-4963
20. Pletnev, A. G. y otros, 1992 PNAS EE.UU. 89:10532-10536;
21. Pletnev, A. G. & Men, R. 1998 PNAS EE.UU. 95: 1746-1751;
- 25 22. Pletnev, A. G. y otros, 2000 Virología 274:26-31;
23. Pletnev, A. G. y otros, 2001 J Virol 75:8259-8267
24. Worobey, M. y otros, 1999 PNAS EE.UU. 96:7352-7
25. Van Der Most, R. G. y otros, 2000 J Virol 74:8094-8101;

Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes, figuras y otras referencias citadas o referencias acá y todos los documentos citados o referencias en los documentos acá citados, junto con cualquier instrucción del fabricante, descripción, especificación de producto, y hojas de producto para cualquier producto
5 mencionado acá o en cualquier documento incorporado por referencia acá, se incorporan por referencia en este documento, y se pueden emplear en la práctica de la invención.