

**REIVINDICACIONES:**

1. Un proceso para preparar una vacuna tetravalente atenuada contra el dengue, CARACTERIZADO PORQUE comprende:

(i) amplificar las células Vero en cultivo para producir bancos de células Vero maestro y de trabajo, en donde las células Vero se adaptan para su crecimiento en un medio libre de suero, se cultivan en un medio libre de suero, y se subcultivan con una tripsina que no es de origen animal de estas células en frascos de cultivo tisular (TC) de 225 cm<sup>2</sup> y posteriormente en un Cell Factory System™ (CFS);

(ii) infectar las células Vero del banco maestro o de trabajo con los serotipos 1, 2, 3 y 4 del virus del dengue de un banco de siembra o de trabajo de cada virus, en donde las células Vero se infectan de manera independiente con los serotipos 1, 2, 3 y 4 del virus del dengue en cultivos separados con medio libre de suero;

(iii) incubar los frascos TC de 225 cm<sup>2</sup> o Cell Factory System™ (CFS) que contiene las células Vero infectadas con cada virus del dengue a 36,5 °C (± 1 °C) por entre 10 y 20 días;

(iv) cosechar los sobrenadantes de cada cultivo;

(v) filtrar cada suspensión de virus del dengue del paso (iv) a través de una membrana con 0,2 µm de porosidad y guardar el virus del dengue filtrado a -80 °C (± 5 °C);

(vi) preparar preparaciones a granel de los serotipos 1, 2, 3 y 4 del virus del dengue;

(vii) formular vacunas monovalentes;

(viii) formular una vacuna tetravalente mediante mezclado de las

vacunas monovalentes;

- (ix) llenar los viales con la vacuna tetravalente;
- (x) liofilizar la vacuna tetravalente en los viales;
- (xi) sellar los viales con la vacuna tetravalente liofilizada; y
- (xii) guardar el producto liofilizado y sellado a 2-8 °C, con lo cual se

preparó una vacuna tetravalente atenuada contra el dengue.

2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE el sobrenadante se cosecha en el paso (iv), se agrega un volumen igual de medio libre de suero al cultivo, y se repiten los pasos (iii) y (iv).

3. El proceso de acuerdo con la reivindicación 2, CARACTERIZADO PORQUE los pasos (iii) y (iv) se repiten entre una y siete veces aproximadamente.

4. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE las cepas del virus del dengue usadas son rDEN1Δ30-1545 (SEQ ID N°: 1) o una variante de la misma; rDEN2/4Δ30(ME)-1495,7163 (SEQ ID N°: 2) o una variante de la misma; rDEN3Δ30/31-7164 (SEQ ID N°: 3) o una variante de la misma y rDEN4Δ30-7132,7163,8308 (SEQ ID N°: 4) o una variante de la misma.

5. Un proceso para preparar una vacuna tetravalente atenuada contra el dengue, CARACTERIZADO PORQUE comprende:

(i) amplificar las células Vero en cultivo para producir bancos de células Vero maestro y de trabajo, en donde las células Vero se adaptan para su crecimiento en un medio libre de suero, se cultivan en un medio libre de suero y se subcultivan con una tripsina que no es de origen animal;

(ii) infectar las células Vero del banco maestro o de trabajo con los

serotipos 1, 2, 3 y 4 del virus del dengue de un banco de siembra o de trabajo de cada virus, en donde las células Vero se infectan de manera independiente con los serotipos 1, 2, 3 y 4 del virus del dengue en cultivos separados con medio libre de suero;

(iii) incubar las células Vero infectadas con cada virus del dengue a 36,5 °C ( $\pm$  1 °C) por entre 10 y 20 días en un frasco de cultivo tisular o en un Cell Factory System™;

(iv) cosechar los sobrenadantes de cada cultivo;

(v) filtrar cada suspensión de virus del dengue del paso (iv) a través de una membrana con 0,2  $\mu$ m de porosidad y guardar el virus del dengue filtrado a -80 °C ( $\pm$  5 °C);

(vi) preparar preparaciones a granel de los serotipos 1, 2, 3 y 4 del virus del dengue;

(vii) formular vacunas monovalentes; y

(viii) formular una vacuna tetravalente mediante mezclado de las vacunas monovalentes.

6. El proceso de acuerdo con la reivindicación 5, CARACTERIZADO PORQUE la línea de células Vero usada es ATCC CCL-81.4.

7. El proceso de acuerdo con la reivindicación 5, CARACTERIZADO PORQUE el sobrenadante se cosecha en el paso (iv), se agrega un volumen igual de medio libre de suero al cultivo, y se repiten los pasos (iii) y (iv).

8. El proceso de acuerdo con la reivindicación 7, CARACTERIZADO PORQUE los pasos (iii) y (iv) se repiten entre una y siete veces aproximadamente.

9. El proceso de acuerdo con la reivindicación 5, CARACTERIZADO

PORQUE las cepas del virus del dengue usadas son rDEN1Δ30-1545 (SEQ ID N°: 1) o una variante de la misma; rDEN2/4Δ30(ME)-1495,7163 (SEQ ID N°: 2) o una variante de la misma; rDEN3Δ30/31-7164 (SEQ ID N°: 3) o una variante de la misma y rDEN4Δ30-7132,7163,8308 (SEQ ID N°: 4) o una variante de la misma.

10. El proceso de acuerdo con la reivindicación 9, CARACTERIZADO PORQUE la multiplicidad de infección (MOI) de las cepas del virus del dengue para cada serotipo del dengue es: entre 0,01 y 0,03 para DENV 1 y 4, entre 0,02 y 0,04 para DENV 2 y entre 0,05 y 0,08 para DENV3.

11. El proceso de acuerdo con la reivindicación 5, CARACTERIZADO PORQUE las vacunas monovalentes se mezclan a la misma relación de volumen para obtener la vacuna tetravalente contra los serotipos 1,2,3,4 del dengue (atenuada).

12. El proceso de acuerdo con la reivindicación 5, CARACTERIZADO PORQUE además comprende los pasos de llenar los viales con la vacuna tetravalente; liofilizar la vacuna tetravalente en los viales; sellar los viales con la vacuna tetravalente liofilizada; y guardar el producto liofilizado y sellado a 2-8 °C.

13. El proceso de acuerdo con la reivindicación 12, CARACTERIZADO PORQUE los parámetros usados en el proceso de liofilización son: congelamiento (entre -30 y -50 °C), vacío (entre 20 y 100 μbar), secado primario a valores de entre -30 y -50 °C (36 a 42 h) y entre -5 y -10 °C (18 a 24 h) un secado secundario a valores de entre 25 y 29 °C (8 a 15 h).

14. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE se agrega un estabilizador a preparaciones a granel del virus del dengue antes de formular vacunas monovalentes.

15. El proceso de acuerdo con la reivindicación 14, CARACTERIZADO PORQUE el estabilizante es galactosa.

16. El proceso de acuerdo con la reivindicación 5, CARACTERIZADO PORQUE se agrega un estabilizador a preparaciones a granel del virus del dengue antes de formular vacunas monovalentes.

17. El proceso de acuerdo con la reivindicación 16, CARACTERIZADO PORQUE el estabilizante es galactosa.