

**MÉTODO DE PRODUCCIÓN DE COMPOSICIONES
FARMACÉUTICAS QUE COMPRENDE EL VIRUS CHIKUNGUNYA
INMUNOGÉNICO CHIKV-DELTA5NSP3**

5

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un proceso para producir un virus Chikungunya atenuado inmunogénico, así como también composiciones que comprenden el mismo.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10

El Virus Chikungunya (por sus siglas en inglés, CHIKV) es un virus de ARN de hebra sencilla, de sentido positivo del género Alphavirus, familia Togaviridae. La enfermedad de virus Chikungunya es principalmente un brote de enfermedad y está asociada con altas proporciones de ataque.

15

El virus es transmitido a humanos mediante un vector de mosquito y provoca fiebre, salpullido, fatiga y poliartralgia severa. Las infecciones con CHIKV en general se resuelven espontáneamente y usualmente no es fatal, excepto en casos raros que involucran el CNS, en donde la proporción de muerte

20

es entre 10 a 30 por ciento. Particularmente en riesgos para la enfermedad del CNS con CHIKV son infantes de menos de un año y adultos de más de 65 años, con una proporción de infección de 25 veces y 6 veces mayor que la población general, respectivamente. La proporción de discapacidades

25

persistente en niños después de encefalitis por CHIKV se

estima entre 30 y 45 por ciento (Gerardin P. et al., Chikungunya Virus -associated encephalitis A cohort study on La Reunión Island, 2005-2009 (2016) Neurology 86:1-9). Además, aproximadamente 30 por ciento de todos los pacientes
5 con Chikungunya experimentan artralgia por meses hasta años después de la recuperación. En algunos casos pueden ocurrir complicaciones neurológicas, renales, cardíacas, respiratorias o hepáticas.

Actualmente están disponibles vacunas o medicamentos
10 para prevención o tratamiento de la enfermedad de virus Chikungunya. Los brotes en el pasado han ocurrido principalmente en África, pero en el genotipos de Sudáfrica del Este central (ECSA) recientemente ha expandido su intervalo geográfico, resultando en brote en la India, Asia,
15 y aún en Europa templada (Weaver, S., Arrival of Chikungunya Virus in the New World: Prospects for Spread and Impact on Public Health (2014) PLOS Neglected Tropical Diseases 8(6): e2921). A pesar que el CHIKV ha sido repetidamente importado a las Américas desde 1995, la transmisión autóctona no ha
20 sido reportada hasta 2013 en el Caribe. Para el 2015, la epidemia se ha expandido al continente y causa más de un millón de causas de sospecha en 27 países en las Américas (Organización Panamericana de la Salud (2015), Número de Casos Acumulados de Fiebre de Chikungunya en las Américas).
25 Epidemias adicionales pueden ser ayudadas en parte por la

expansión del vector mosquito de CHIKV en regiones sin epidemia, así como también la capacidad del CHIKV para adaptarse a especies de mosquito local (Vega-Rua A, *et al.*, Chikungunya Virus Transmission Potential by Local Aedes Mosquitoes in the Americas and Europe (2015) PLOS Neglected Tropical Diseases DOI:10.1371/journal.pntd.0003780). La alta proporción de contagio del Virus Chikungunya, se propagación geográfica, y su potencial para complicaciones de larga duración subraya la necesidad para desarrollar medidas preventivas, tal como vacunas.

Las vacunas contra el virus pueden comprender partículas de CHIKV atenuadas vivas, es decir las partículas de CHIKV vivas las cuales han sido alteradas para reducir la virulencia, pero aún mantienen inmunogenicidad. Un ejemplo de CHIKV atenuado contiene una mutación de supresión en la proteína 3 no estructural (CHIKV-Δ5nsP3; véase **Fig. 2**). La CHIKV-Δ5nsP3 se ha mostrado por conferir inmunidad protectora en ratones (Hallengård D, *et al.* Novel attenuated Chikungunya vaccine candidates elicit protective immunity in C57Bl/6 mice (2014) J. Virol. 88:2858-2866) y en primates no humanos (Roques P, *et al.* Attenuated and vectored vaccines protect non-human primates against Chikungunya Virus (2017) J. Clin. Invest. Insight 2(6):e83527). Estos estudios preliminares *in vivo* en ratones y primates no humanos se hace con el virus CHIKV-Δ5nsP3 producido en tipos de célula células-a BHK-21 en

general no favorecidas por la producción de vacunas humanas. Será necesario, por lo tanto como se describe en la presente, adaptar la producción adaptar la producción del virus CHIKV- $\Delta 5nsP3$ a una plataforma de cultivo de célula más adecuada.

5 Tal adaptación no es un proceso trivial; por ejemplo, se conoce en la técnica que la adaptación del virus a una célula hospedera particular puede conducir a mutaciones que cambian carga de superficie de las partículas del virus. Tales mutaciones adquiridas pueden servir para atenuar el virus; de

10 hecho, se ha usado pases en serie para desarrollar tales partículas de virus atenuada que se usan en muchas vacunas contra virus. Con respecto a CHIKV, se han mostrado que el pase repetido *in vitro* del virus Chikungunya tipo silvestre virulento puede conducir a cierto punto de mutación,

15 resultando en atenuación parcial o completa del virus (Gardner CL, et al., Deliberate Attenuation of Chikungunya Virus by Adaptation to Heparan Sulfate-Dependent Infectivity: A Model for Rational Arboviral Vaccine Design (2014) PLOS Neglected Tropical Diseases 8(2): e2719).

20 Ahora sorprendentemente se ha encontrado cierto punto de mutaciones que resultan en la pérdida de inmunogenicidad que puede ocurrir temprano durante el proceso de adaptación del sustrato celular del CHIKV- $\Delta 5nsP3$ atenuado, haciendo el control o reducción de tal punto de mutaciones

25 una consideración esencial para la producción de un candidato

de vacuna exitoso. Así, la actual invención proporciona un proceso con parámetros bien definidos para la propagación del candidato de vacuna CHIKV- Δ 5nsP3, permitiendo la producción de partículas del virus muy inmunogénicas, mientras
5 simultáneamente se logran tituladores de alta producción en cultivo celular adecuado para aplicación industrial.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad suficiente de virus
10 Chikungunya inmunogénico para obtener una respuesta inmune neutralizante en un sujeto; es decir una respuesta inmune que es protección contra infección con y/o enfermedad causada por el virus Chikungunya. En particular, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende partículas CHIKV-
15 Δ 5nsP3 atenuadas en donde el porcentaje de tales partículas virales con mutaciones que reduce la inmunogenicidad, particularmente mutaciones que reduce la inmunogenicidad en la proteína E2, son minimizadas. La descripción además proporciona para producir una composición farmacéutica que
20 comprende una CHIKV- Δ 5nsP3 atenuada, en donde el proceso minimiza la presencia de mutaciones que reducen la inmunogenicidad en el genoma viral, particularmente mutaciones a E168 de la proteína E2 viral y/u otros residuos E2 y/o residuos en otras proteínas CHIKV estructurales o no
25 estructurales. La descripción actual además proporciona

composiciones farmacéuticas que comprenden un virus Chikungunya atenuado obtenido por el proceso de la invención.

Están actualmente en curso esfuerzos para desarrollar una vacuna contra el virus Chikungunya. Uno de
5 los candidatos de vacuna más avanzados proporciona un constructo quimérico en una plataforma de virus sarampión (véase <http://www.themisbio.com/#/news>). La vacuna, actualmente en ensayos Fase, es derivada de dos dosis ([https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02861586?term=themis&](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02861586?term=themis&recrs=a&rank=2)
10 [recrs=a&rank=2](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02861586?term=themis&recrs=a&rank=2)). Una vacuna de un solo uso puede representar una ventaja distinta en el campo.

En consecuencia, en una modalidad, es un objeto de la presente invención proporcionar una composición farmacéutica estable, bien definida, segura y efectiva tal
15 como por ejemplo, una vacuna contra el virus Chikungunya, preferiblemente una vacuna mejorada que confiere protección con solamente una vacuna, es decir una así llamada vacuna de “un solo uso” a escala industrial usando sustratos celulares comunes, para proporciona procesos para generar tal vacuna
20 estable, bien definida, segura y efectiva y métodos y usos de tal vacuna estable, bien definida, segura y efectiva.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las figuras acompañantes no pretenden ser dibujados a escala. Las figuras son solamente ilustrativas y no
25 requieren ser habilitados para la descripción. Para

propósitos de claridad, no todos los componentes pueden ser etiquetados en cada figura. En las figuras:

Figura 1. Un mapa del plásmido pMX usado para el ensamble completo del genoma CHIKV- Δ 5nsP3 de fragmentos sintetizados. Para el montaje completo de la secuencia CHIKV- Δ 5nsP3, se usó el plásmido pMX con un casete de resistencia a Ampicilina (pMA). Las series de vectores pMX se basan en vectores de clonación similares a la línea pUC, pero deja fuera los promotores no necesarios a corte (nivel de bioseguridad 1).

Figura 2. Ilustración esquemática de la estructura del genoma CHIKV- Δ 5nsP3. El genoma del virus Chikungunya codifica dos poliproteínas: proteínas no estructurales 1-4 (nsP1-4) y proteínas estructurales (c, E3, E2, 6K, E1). Comparada con la secuencia genómica de tipo silvestre, la secuencia CHIKV- Δ 5nsP3 contiene una supresión de 183 bp en la parte 3' de la secuencia que codifica nsP3 (aminoácidos 1656 a 1717 en la poliproteína nsP1-4), lo cual resulta en una supresión de 60 aminoácidos en la proteína de replicasa nsP3 (indicada por Δ 60aa). SP, promotor subgenómico; UTR, región no traducida. (Figura adaptada de Hallengård D, et al., 2014, *supra*.)

Figura 3 La estrategia de clonación para ensamblar el genoma CHIKV- Δ 5nsP3 en pMA. (Figura 3A) Diseño esquemático de fragmentos de polinucleótido sintetizados que cubren el

genoma CHIKV-Δ5nsP3 completo. (Figura 3B) Estrategia de clonación para ensamble del genoma CHIKV-Δ5nsP3 en el plásmido 1 pMA. La clonación del fragmento 2 CHIKV-Δ5nsP3 en el fragmento 1 que contiene pMA (fragmento 1 pMA) mediante
 5 *EcoRI* y *PacI*. 2. Ensamblar el fragmento 4 y el fragmento 3 mediante *ClaI* y *PacI*. 3. Preparación del fragmento 5 digerido con *XhoI* y *PacI* en pMA para ensamble completo. 4. Ensamble completo del genoma CHIKV-Δ5nsP3 en pMA por fusión de los fragmentos 3 y 4 *AgeI/XhoI* digeridos y fragmento 5 *XhoI/PacI*
 10 digerido con los fragmentos 1 y 2 de pMA *AgeI/PacI* linearizados. El ensamble del genoma CHIKV-Δ5nsP3 corregido se verificó mediante secuenciamiento Sanger.

Figura 4 Rendimiento, tamaño de placa e inmunogenicidad de CHIKV-Δ5nsP3 después de para en células
 15 Vero. El virus e hizo pasar en tres réplica en paralelo (Figuras 4A, 4B y 4C) partiendo de un P0 común (rescate) como se detalla en la Tabla 2. (Figura 4A) Los tituladores de virus 24 h después de la infección de células Vero del pasaje 0 al pasaje 16. Se muestra el título promedio de las
 20 tres réplicas (Figuras 4A, 4B y 4C). Figura 4B. Tituladores relativos de P0, P5 y P15 de CHIKV-Δ5nsP3 se valoran como un ensayo de placa. Las células Vero se sembraron a una densidad de 4×10^5 células por cavidad en placas de 6 cavidades en MEM suplementado con 5% de FBS, 2 mM de L-
 25 Glutamina y 1% de Antibiótico-Antimicótico (anti-anti) y se

incubaron durante la noche a 35°C y 5% de CO₂. Al siguiente día, el cultivo sobrenadante se removió de células Vero y diluciones seriales de CHIKV-Δ5nsP3 se agregaron en las células. Después de la incubación por 1 hora a 35°C/ 5% de CO₂, se agregó un revestimiento de metilcelulosa con una concentración final de 2% y las células se incubaron adicionalmente por 3 días a 35°C/5% de CO₂. Finalmente, las placas se cuantificaron después del teñido violeta del cristal (0.5% de violeta en cristal en 5% de formaldehído) para valorar el título del virus (pfu/ml) y tecnologías de placa. (Figura 5C) Inmunogenicidad de CHIKV-Δ5nsP3 P0, P5B, P8B y P15C como se valoró por neutralización de CHIKV-Δ5nsP3 (P0) en PRNT en células Vero. Las células Vero se sembraron en placas de 12 cavidades a una densidad de 3x10⁵ células y se incubaron durante la noche a 35°C/5% de CO₂. Se inmunizaron grupos de cinco ratones C57B1/6 una vez subcutáneamente con una dosis de 10⁵ de TCID₅₀ de los pasajes CHIKV-Δ5nsP3 respectivos. Se usó CHIKV-Δ5nsP3 a P0 (rescate de virus), también a 10⁵ de TCID₅₀ como un posible control. Día 21, se mezclaron combinaciones de suero de diluciones seriales a 4 veces que varían desde 1:20 a 1:327,680 con 560 pfu/ml de CHIKV-Δ5nsP3 (a P0) y se incubaron por una hora. Las mezclas CHIKV-Δ5nsP3/neutralización después se agregaron a células Vero y las placas se incubaron por 2 horas a 35°C/5% de CO₂. Esta

etapa se siguió por 2% de un recubrimiento de metilcelulosa y las placas se incubaron por ~60 horas a 35°C/5% de CO₂. Después de remover el recubrimiento, las células se tiñeron con violeta cristal/5% de formaldehído y las placas se
 5 cuantificaron.

Figura 5 Efecto de MOI controlado (0.01) durante el paso de CHIKV-Δ5nsP3 en inmunogenicidad. **(Figura 5A)** Ilustración esquemática de CHIKV-Δ5nsP3 pasando en células Vero bajo condiciones no controladas y controladas. El CHIKV-
 10 Δ5nsP3 P0 se hizo pasar en células Vero a P3B bajo condiciones no controladas con MOI variado (como se resumen en la **Tabla 2**; Réplica B). Usando P3B como un material de partida, se llevó a cabo un proceso infeccioso controlado con todas las infecciones subsecuentes en el MOI definido de 0.01
 15 para generar un pasajes P4, dos pasajes P5 y un pasaje P6 para análisis de inmunogenicidad en ratones. **(Figura 5B)** La Inmunogenicidad de P0 (○), P2B (□), P5#1 (●), P5#2 (◆), P6 (■) y P15 (Δ) CHIKV-Δ5nsP3 como se valoró por neutralización de CHIKV-Δ5nsP3 (P2) en PRNT en células Vero. Se inmunizaron
 20 subcutáneamente grupos de diez ratones C57b1/6 con una dosis única de las preparaciones CHIKV-Δ5nsP3 respectivas a una dosis planeada de 10⁵ de TCID₅₀ y en el día 21 después de la inmunización, se valoraron suero combinado para capacidad de neutralización CHIKV-Δ5nsP3 (560 pfu/ml) en diluciones
 25 seriales a 4 veces que varía desde 1:20 a 1:327,680 como se

describe por la **Figura 4**.

Figura 6 Inmunogenicidad y heterogeneidades genómicas observadas de aislados de placa única de CHIKV- Δ 5nsP3 a partir de P5B y P8B. Dos recolectas rescatadas de virus CHIKV- Δ 5nsP3 (4399grI P0 (#1) y 4415grI P0 (#2)) y una recolecta de CHIKV- Δ 5nsP3 P15 (P15C-DS) sirve como controles inmunogénicos y no inmunogénicos, respectivamente. **(Figura 6A)** Se valoró la inmunogenicidad de aislados de placa única P5B-11, P5B-03 y P8B-05 de CHIKV- Δ 5nsP3 por neutralización de CHIKV- Δ 5nsP3 (P2) en PRNT sobre células Vero. Se inmunizaron subcutáneamente grupos de diez ratones C57B1/6 con una dosis única de aislados CHIKV- Δ 5nsP3 respectivos a la dosis de TCID₅₀ indicada en el día 19 después de la inmunización, se valoraron suero combinado por CHIKV- Δ 5nsP3 (560 pfu/ml) con capacidad de neutralización a diluciones serial por 4 veces que varían desde 1:20 a 1:327,680 como se describe por la **Figura 4**. **(Figura 6B)** Genomas esquemáticos de aislados de placa P5B-11, P5B-03 y P8B-05 de CHIKV- Δ 5nsP3 derivados de secuenciamiento Sanger que cubre el genoma CHIKV- Δ 5nsP3 completo con mutaciones indicados de punto identificado. **(Figura 6C)** Se valoró la inmunogenicidad de aislados de placa P5B-02, P5B-04, P5B-07 y P8B-01 de CHIKV- Δ 5nsP3 como en (Figura 6A). **(Figura 6D)** Genomas esquemáticos de aislados de placa única P5B-02, P8B-01, P5B-04 y P5B-07 de CHIKV- Δ 5nsP3 derivada de secuenciamiento Sanger del genoma CHIKV- Δ 5nsP3

completa mutaciones indicadas de punto identificado.

Figura 7 Cromatogramas de secuenciamiento Sanger de CHIKV- Δ 5nsP3 en el pasaje 0 (P0) y cuatro muestras de CHIKV- Δ 5nsP3 independientemente generadas en el pasaje 3 (P3 Ejemplos 1-4), heterogeneidades E168K y E247K reveladoras en la proteína E2 que surge por el pasaje 3. Las cuatro muestras de CHIKV- Δ 5nsP3 independientemente generadas en P3 (P3 Ejemplos 1-4) son todas derivadas del mismo MVSB (P1). Las regiones muestran regiones genómicas cubiertas que codifican aminoácidos 168 y 247 de la proteína E2 y se secuenciaron con pares de cebador 16 y 17 como se indica. (Para las secuencias cebadoras, véase **Tabla 1**). Para comparación, se muestran cromatogramas de secuenciamiento de CHIKV- Δ 5nsP3 en el pasaje 0 (P0). Los sitios de heterogeneidades de secuencia son indicadas por los cuadros.

Figura 8 El secuenciamiento de la siguiente generación (NGS) de un Banco de Semilla de Virus Principal (PI) y dos preparaciones CHIKV- Δ 5nsP3 de pasaje tres (P3) independientemente generadas: (**Figura 8A**) P1-MVSB; (**Figura 8B**) P3-Ejemplo 3; (**Figura 8C**) P3-Ejemplo 4. Un nivel antecedente de heterogeneidades genómicas se establece a 15% como se indica por la línea punteada. Las heterogeneidades más frecuentes que surgen por el pasaje 3 incluyen mutaciones de punto en posiciones 8882 y 9119 de ácido nucleico genómico, las cuales corresponden a la mutaciones E168K y

E247K, respectivamente, en la proteína E2 como se indica en (Figura 8B) y (Figura 8C).

Figura 9 Ubicación de las posiciones de aminoácido con heterogeneidades frecuentemente observadas (G55R, G82R, E168K y E247K) dentro de la glicoproteína E2 marcada en posiciones equivalentes en una estructura de VLP de CHIKV de la cepa Senegal 37997 (PDB 3J2W; Sun S, *et al.*, Structural analyses at pseudo atomic resolution of Chikungunya Virus and antibodies show mechanisms of neutralization (2013) eLife 2:e00435. DOI: 10.7554/eLife.00435). El G55R es indicado por un cuadrado, G82R es indicado por un círculo, E168K es indicado por un triángulo y E247K es indicado por una estrella. Las figuras muestran las proteínas CHIKV de la unidad celular ya que puede ser ensamblada en la membrana viral, compuesta de cuatro copias de dímero E1/E2 con la porción de transmembrana (TM) indicada por soportes, y la proteína de cápsido (C) en el lado interior (fondo) de la membrana. Tres ensambles E1/E2/cápsido compuestos de espigas i3 en el eje de 3 veces, todas en la representación de superficie y visualizada de tres ángulos diferentes: **(Figura 9A)** vista lateral de unidad celular de CHIKV; punto de vista por abajo del plano de membrana. **(Figura 9B)** vista lateral de unidad celular CHIKV; punto de vista del plano de membrana **(Figura 9C)** vista superior de la unidad celular de CHIKV.

Figura 10 Grupos para inmunización subcutánea de

ratones C57B1/6 con preparaciones del virus de diferentes relaciones de P3:P5B-07 (E168K) para determinar el umbral al cual la presencia de la mutación de punto E168K resulta en pérdida de inmunogenicidad de CHIKV-Δ5nsP3 a una dosis de aproximadamente 3×10^4 TCID₅₀. Las relaciones de formulación de P3 y P5B-07 (mutante E168K) para los grupos 1, 3 y 5 fueron 1:0.1, 1:1 y 1:10, respectivamente, con una dosis propuesta de 3×10^4 TCID₅₀. Adicionalmente, el grupo 6 y grupo 7 representan P3 solo y P5B-07 (E168K) solo, respectivamente.

La secuencia de referencia (tipo silvestre) en la posición heterogénica (que corresponde al nucleótido 8882) fue G y dependiendo de la relación de ya sea 1:0.1, 1:1 o 1:10, un cambio hacia el nucleótido A, es decir, G>A a G=A o G<A, fue de conformidad con los cromatogramas de secuenciamiento. La población viral P3 presentó ~ 20% de mutantes E168K. La población viral de P5B-07 (E168K) no mostró heterogeneidad (es decir, ~100% contenido en la mutación E168K de la proteína E).

Figura 11 Efecto de inmunogenicidad de diferentes relaciones de P3 a CHIKV-Δ5nsP3 mutante-E168K evaluadas por ensayo de neutralización a base de VRP. Los sueros de ratón individual se generaron por inmunización subcutánea de ratones C57B1/6 con una dosis propuesta de 3×10^4 TCID₅₀ de CHIKV-Δ5nsP3 P3:E168K a relaciones 1:0.1, 1:1 y 1:10 como se resumen en la **Figura 10**. Al día 21 se analizó el suero

individual para neutralización de partículas de replicón del virus de LR-CHIKV (VRPs) usando un ensayo de Luciferasa a base de células BHK-21. Los VRPs se asemejan a un CHIKV de tipo silvestre de replicación deficiente que despliega

5 proteínas de envoltura y cápsidos del virus de tipo silvestre LR2006-OPY1. Brevemente, células 2×10^4 BHK-21 se sembraron en placas de 96 cavidades e incubaron durante la noche a $35^\circ\text{C}/5\%$ de CO_2 . Se incubaron CHIKV- $\Delta 5\text{nsP3}$ VRPs con diluciones seriales (partiendo a 1:20 hasta 1:312,500) de suero de ratón

10 por 1 hora a 35°C . Las mezclas de CHIKV VRP/suero se agregaron a células BHK-21 a un MOI de 5 e incubaron por 1 hora a $35^\circ\text{C}/5\%$ de CO_2 . Las células se lavaron y se agregó medio fresco. La actividad de luciferasa se midió en el sobrenadante 24 horas post-infección usando el Sistema de

15 Ensayo de Luciferasa Renilla (Promega). El control positivo de P-MVSB ($\circ$), control negativo de P5B-07 (E168K) ($\square$) y suero de ratón individual inmunizado con relación respectiva de P3:E168K (círculos llenos). **(Figura 11A)** Inmunogenicidad de CHIKV- $\Delta 5\text{nsP3}$ P3:E168K a una relación de 1:0.1 (Grupo 1).

20 **(Figura 11B)** Inmunogenicidad de CHIKV- $\Delta 5\text{nsP3}$ P3:E168K a una relación de 1:1 (Grupo 3). **(Figura 11C)** Inmunogenicidad de CHIKV- $\Delta 5\text{nsP3}$ P3:E168K a una relación de 1:10 (Grupo 5). **(Figura 11D)** Sumario de resultados de inmunogenicidad mostrados en Figura 11A, 11B, y 11C: inmunogénico fuerte (++) positiva), bajo inmunogénico (+bajo positivo) y negativo (-)

25

en comparación con P3.

Figura 12 Serie de cultivo de células Vero de descongelación para infección con CHIKV- Δ 5nsP3 en botellas rodantes de 850 cm². P: Pasaje, M: Millón, T75: Matraz T de 75 cm², T175: Matraz-T de 175 cm², RB850: Botella Rodante CellBIND de 850cm².

Figura 13 Efecto del titulador del virus de temperatura de crecimiento celular, multiplicidad de infección y tiempo de infección post-sembrado durante la producción de CHIKV- Δ 5nsP3 en células Vero. Las células Vero se expandieron a 35°C en MEM, 2 mM de glutamina y 10% de FBS y se sembraron en Botellas Rodantes de 850 cm² para infección celular. Para producción del virus, diferentes temperaturas (37°C, 35°C, 28°C), MOIs (0.1; 0.01; 0.001 TCID₅₀/célula) y tiempos de infección celular post-sembrado de células Vero en los días (D2, D4, D5) se probaron en medio de cultivo desprovisto de FBS. Las productividades virales se muestran medidas en células Vero de conformidad con el método de Reed & Muench se expresan en TCID₅₀/mL. **(Figura 13A)** 37°C; **(Figura 13B)** 35°C; **(Figura 13C)** 28°C.

Figura 14 Productividad total del virus CHIKV- Δ 5nsP3 a partir de cada una de las condiciones descritas en la **Figura 13**.

Figura 15 Tituladores máximos del virus CHIKV- Δ 5nsP3: Modelo cuadrático de superficie de respuesta. **(Figura**

15A) Análisis ANOVA del modelo. Línea gris: término de modelo
significante ($\text{Sonda}(F) < 0.05$; valores mayores de 0.1 indican
que el término modelo no es significativo). **(Figura 15B)**
Contorno del Trazo del modelo.

5 **Figura 16** Estabilidad del virus CHIKV- $\Delta 5\text{nsP3}$:
Modelo cuadrático de superficie de respuesta. **(Figura 16A)**
Análisis ANOVA del modelo. Línea gris: término del modelo
significante ($\text{Sonda}(F) < 0.05$; valores mayores de 0.1 indican
que el término modelo no es significativo). **(Figura 16B)**
10 Contorno del trazo del modelo.

Figura 17 Heterogeneidad de la proteína viral de E2
CHIKV- $\Delta 5\text{nsP3}$ en las posiciones del ácido nucleico genómico
8882, 9112 y 9649, que corresponden a los aminoácidos E2 168,
247 y 423, respectivamente: Análisis del modelo del Día 2 de
15 recolecciones de muestra de CHIKV- $\Delta 5\text{nsP3}$. **(Figura 17A)**
Análisis ANOVA del modelo: línea gris: término modelo
significante ($\text{Sonda}(F) < 0.05$). **(Figura 17B)** Contorno de
trazo del modelo.

Figura 18 Heterogeneidad de la proteína viral E2 de
20 CHIKV- $\Delta 5\text{nsP3}$ en las posiciones de ácido nucleico genómico
8882, 9112 y 9649; que corresponden a los aminoácidos E2 168,
247 y 423, respectivamente: Análisis del modelo de
recolecciones de muestra de CHIKV- $\Delta 5\text{nsP3}$ del Día 2 y Día 5
(28°C). **(Figura 18A)** Análisis ANOVA del modelo. Línea gris:
25 término de modelo significativo ($\text{Sonda}(F) < 0.05$). **(Figura**

18B) Contorno de trazo del modelo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Durante el curso de industrialización del candidato
5 de vacuna del virus atenuado de CHIKV-Δ5nsP3, se observó que
el pasaje del virus en células Vero resultó en tituladores de
virus superiores con pasajes incrementados; sin embargo, un
incremento concomitante en heterogeneidad de secuencia del
genoma viral de CHIKV-Δ5nsP3 también se observó. Ciertas
10 mutaciones de punto que se originan durante el pasaje en
células Vero se encontraron por ser reproducibles de lote a
lote y parecen ya en pasajes tempranos en el nuevo sustrato
celular. Se observó de manera sorprendente que algunas de
estas mutaciones se correlacionan con una pérdida
15 significativa de, o reducción en la neutralización de
inmunogenicidad conferida por el virus de CHIKV-Δ5nsP3. Otras
mutaciones reproducibles no reducen la inmunogenicidad y/o
actúan como mutaciones "de rescate" para las mutaciones que
reducen la inmunogenicidad. Se identificó una correlación
20 entre una baja multiplicidad de infección ("MOI") y la
generación de heterogeneidad de secuencia incrementada en
CHIKV-Δ5nsP3; sin embargo, debido a la necesidad de tener una
fuente única de virus durante años de manufacturación, los
altos MOIs son en general no factibles para uso industrial.
25 Por lo tanto no fue claro en el comienzo si las condiciones

de cultivo que permiten la generación de partículas inmunogénicas de CHIKV- Δ 5nsP3 con un rendimiento de producción suficiente para manufacturación confiable y reproducible podría encontrarse (problema de la invención).

5 Se proporcionan en la presente métodos para controlar y minimizar aquí las mutaciones de reducción de inmunogenicidad observadas mientras todavía permiten los altos rendimientos de producción. También se proporcionan en a presente composiciones farmacéuticas que comprenden una
10 cantidad efectiva de un virus de chikungunya inmunogénico con una cantidad residual de una variante no inmunogénica del Virus Chikungunya. En una modalidad preferida, la composición farmacéutica se produce usando un MOI bajo tal como un MOI de menos de 0.1, por ejemplo, 0.01 o 0.001, pero producido bajo
15 condiciones controladas (por ejemplo, números de pasaje reducidos después del rescate, temperatura optimizada y confluencia de células hospederas) para minimizar las cantidades de variante(s) no inmunogénica(s) del Virus Chikungunya como se describe en la presente. En algunas
20 modalidades, la partícula del virus es un virus vivo, un virus quimérico, un virus vivo atenuado, un virus vivo modificado, o un virus vivo recombinante. En una modalidad, las partículas del virus de la invención pueden ser opcionalmente inactivadas. En algunas modalidades, la
25 partícula del virus es una forma atenuada de la partícula del

virus. Por ejemplo, el virus puede tener infectividad reducida, virulencia, y/o replicación en un hospedero, comparado con un virus de tipo silvestre. En algunas modalidades, el virus es un virus mutado o modificado, por ejemplo, el ácido nucleico del virus puede contener al menos una mutación relativa con el virus de tipo silvestre, tal como una sustitución o supresión. En algunas modalidades, el virus es un virus vivo recombinante, significando que un virus que es generado recombinantemente y puede contener secuencias de ácido nucleico a partir de diferentes fuentes. En algunos aspectos, el Virus Chikungunya de tipo silvestre es inactivado. En una modalidad preferida, el virus es inactivado con formaldehído.

En una modalidad, the virus chikungunya inmunogénico es un virus atenuado vivo. En una modalidad preferida, el Virus Chikungunya atenuado vivo es el CHIKV- Δ 5nsP3 protector como se describe por Hallengård D, *et al.* (*supra*), referido en la presente como CHIKV- Δ 5nsP3 y definido por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1. Brevemente, el genoma CHIKV de tipo silvestre lleva un genoma de ARN de hebra única de sentido positivo de 11 kb que contiene dos marcos lectores abiertos que codifican las proteínas no estructurales (nsP1 a nsP4) y proteínas estructurales (C, E3, E2, 6K, y E1), respectivamente. Un virus CJIK atenuado, CHIKV- Δ 5nsP3, con base en la cepa La

Reunion CHIKV LR2006-OPY1, se construyó sustituyendo residuos de aminoácido 1656 a 1717 de la poliproteína P1234 con un enlazador pequeño (secuencia AA AYRAAAG) en la región hipervariable de la proteína nsP3 (véase **Fig. 2**). El CHIKV-
5 Δ 5nsP3 ha sido mostrado por ser infecciosos, altamente inmunogénico y protector contra la estimulación con CHIKV de tipo silvestre (Hallengård D, *et al.*, *supra* and Hallengård D, *et al.*, Prime-Boost Immunization Strategies against Chikungunya Virus (2014) J. Virology, 88(22):13333-13343, y
10 Roques P, *et al.* 2017, *supra*). En una modalidad, el Virus Chikungunya atenuado vivo puede ser una variante del virus mutante atenuado de CHIKV- Δ 5nsP3. En una modalidad preferida, el Virus Chikungunya atenuado vivo como se proporciona en la presente comprende el CHIKV- Δ 5nsP3 como se codifica por la
15 secuencia de ácido nucleico definida por la SEQ ID NO: 1. Como se usa en la presente, el término "CHIKV- Δ 5nsP3" es usado intercambiamente con el "virus CHIKV- Δ 5nsP3", "partícula CHIKV- Δ 5nsP3", "partícula del virus CHIKV- Δ 5nsP3" o versiones plurales de los mismos.

20 Se proporciona en la presente una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de un CHIKV- Δ 5nsP3. En un aspecto, una cantidad efectiva de un virus CHIKV- Δ 5nsP3 inmunogénico se define como una cantidad suficiente para provocar la neutralización de anticuerpos al
25 Virus Chikungunya. En un aspecto adicional, una cantidad

efectiva de un virus CHIKV- Δ 5nsP3 inmunogénico se define como una cantidad para provocar una respuesta inmune en un sujeto vacunado el cual confiere inmunidad protectora contra la infección del Virus Chikungunya. En un aspecto preferido, una
5 cantidad efectiva de CHIKV- Δ 5nsP3 se define como al menos 10^2 , al menos 10^3 , al menos 10^4 , al menos 10^5 , al menos 10^6 , preferiblemente al menos 10^3 partículas de CHIKV- Δ 5nsP3 inmunogénicas. En un aspecto, las partículas CHIKV- Δ 5nsP3 inmunogénicas se definen como partículas CHIKV- Δ 5nsP3 las
10 cuales expresan una proteína estructural E2 como se define por la secuencia de polipéptido de la SEQ ID NO: 2. En un aspecto, la proteína estructural E3 contiene una o más mutaciones de punto que no afectan la inmunogenicidad del virus, es decir, no se reducen de inmunogenicidad. En una
15 modalidad, las mutaciones de punto que no afectan la inmunogenicidad del virus pueden estar en los aminoácidos 232 y/o 247 de la proteína E2, tal como H232Y y/or E247K. En una modalidad, la proteína estructural E3 del CHIKV- Δ 5nsP3 contiene no más de aproximadamente diez mutaciones de punto.
20 En una modalidad, la proteína estructural E3 del CHIKV- Δ 5nsP3 contiene no más de 9, 8, 7, 6, 5 o 4 mutaciones de punto. En una modalidad preferida, la proteína estructural E3 del CHIKV- Δ 5nsP3 contiene tres o menos mutaciones de punto, muy preferiblemente solamente una o dos mutaciones de punto.

25 Como se define en la presente, un CHIKV- Δ 5nsP3

inmunogénico es un CHIKV-Δ5nsP3 el cual es capaz de estimular una respuesta inmune efectiva *in vivo* cuando se suministra por ejemplo, a una dosis de aproximadamente 3×10^4 TCID₅₀, es decir, en la cual se produce neutralización de anticuerpos

5 los cuales son suficientes para reducir o prevenir signos o síntomas de la enfermedad de virus Chikungunya. En una modalidad preferida, el CHIKV-Δ5nsP3 inmunogénico como se define en la presente es un CHIKV-Δ5nsP3 el cual expresa una proteína estructural E2 de conformidad con la secuencia de

10 aminoácido proporcionada por la SEQ ID NO: 2. En una modalidad preferida adicional, el CHIKV-Δ5nsP3 inmunogénico como se define en la presente se define por la secuencia de polinucleótido de conformidad con la SEQ ID NO: 1. Como una definición alternativa o adicional, el CHIKV-Δ5nsP3

15 inmunogénico de la invención actual estimula la producción de anticuerpos con capacidad neutralizante en un sujeto inmunizado, es decir, neutralización del Virus Chikungunya en un ensayo *in vitro* de al menos 50%, preferiblemente al menos 60%, preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente

20 al menos 80%, aún más preferiblemente al menos 90%, muy preferiblemente al menos 95% a una dilución en suero de 1:80 o superior.

Como se define en la presente, un CHIKV-Δ5nsP3 no inmunogénico es un CHIKV-Δ5nsP3 el cual provoca niveles de

25 neutralización de anticuerpos en un sujeto vacunado

inadecuados par prevenir signos o síntomas de la enfermedad del virus Chikungunya. En una modalidad preferida, un CHIKV- Δ 5nsP3 no inmunogénico es un CHIKV- Δ 5nsP3 el cual expresa una proteína estructural E2 con al menos una sustitución de aminoácido, especialmente sustituciones de aminoácido en la proteína estructural E3, especialmente sustituciones E168K y/o G55R, particularmente una sustitución E168K. Un CHIKV- Δ 5nsP3 no inmunogénico se define además como provocar anticuerpos en un sujeto inmunizado el cual muestra pobre capacidad para neutralizar la infección de células con el Virus Chikungunya (tipo silvestre o atenuado) en un ensayo *in vitro*. En particular, un CHIKV- Δ 5nsP3 no inmunogénico se define como provocar niveles de neutralización de anticuerpos en un sujeto inmunizado el cual proporciona menos de 60%, menos de 50%, menos de 40%, menos de 30%, menos de 20%, especialmente menos de 10%, de neutralización del Virus Chikungunya en un ensayo de neutralización *in vitro* a una dilución de suero 1:80 o superior.

En un aspecto adicional, la cantidad efectiva de CHIKV- Δ 5nsP3 se define como una cantidad suficiente para provocar neutralización de anticuerpos contra el Virus Chikungunya de tipo silvestre. En un aspecto, la composición farmacéutica es una composición farmacéutica de dos tiros. En un aspecto preferido, la composición farmacéutica es una composición farmacéutica de un tiro. En un aspecto preferido,

la composición farmacéutica comprende al menos 10^2 , al menos 10^3 , al menos 10^4 , al menos 10^5 , al menos 10^6 , preferiblemente entre aproximadamente 10^3 hasta 10^5 partículas virales de CHIKV- $\Delta 5nsP3$ total, especialmente aproximadamente 10^3 o 10^4

5 CHIKV- $\Delta 5nsP3$ comprendidos en una combinación total de partículas con y sin mutaciones de punto, especialmente mutaciones de punto de reducción de inmunogenicidad. En un aspecto preferido, la composición farmacéutica comprende una cantidad detectable de CHIKV- $\Delta 5nsP3$ no inmunogénico como se

10 define en la presente; preferiblemente un CHIKV- $\Delta 5nsP3$ no inmunogénico con al menos una mutación de punto comparada con la proteína E2 de tipo silvestre como se define por SEQ ID NO: 2.

En una modalidad preferida, la composición

15 farmacéutica comprende CHIKV- $\Delta 5nsP3$ y comprende una cantidad incrementada de una variante(s) no inmunogénica(s) de CHIKV- $\Delta 5nsP3$, por ejemplo, comparada con una composición de vacuna que comprende CHIKV- $\Delta 5nsP3$ producido en células BHK-21 como se usa en estudios de ratón descritos en Hallengård D, *et al.*

20 2014, *supra*, pero todavía comprenden partículas inmunogénicas suficientes de CHIKV- $\Delta 5nsP3$ para producir inmunidad protectora en un sujeto vacunado. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede comprender (i) CHIKV- $\Delta 5nsP3$ el cual expresa una proteína estructural E2 como se define por la

25 secuencia de polipéptido de la SEQ ID NO: 2 en una cantidad

suficiente para producir inmunidad protectora en un sujeto vacunado; (ii) una cantidad incrementada de CHIKV-Δ5nsP3 que tiene al menos una mutación en tal proteína estructural E2, por ejemplo, comparada con una composición de vacuna que
5 comprende CHIKV-Δ5nsP3 producido en BHK-21 como se usa en estudios de ratón descritos en Hallengård D, *et al.* 2014, *supra*; y (iii) opcionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Se demostró en la presente que la producción de
10 CHIKV-Δ5nsP3 por pasaje serial cinco o más veces en células Vero resulta en altos niveles de heterogeneidad de secuencia, particularmente en la proteína estructural E3 (véase, por ejemplo, el Ejemplo 2 abajo). Por ejemplo, las mutaciones E168K y/o G55R de la proteína E2 a menudo aparecen por el
15 pasaje 5 (véase por ejemplo, **Tabla 3** abajo), y ambas se correlacionan con una caída en inmunogenicidad. Por consiguiente, la producción de CHIKV-Δ5nsP3 usando cinco o más pasajes en células Vero como se describe en Hallengård D, *et al.* 2014 *supra* puede resultar desfavorablemente en altos
20 niveles de mutantes no inmunogénicos de CHIKV-Δ5nsP3 (tales como E168K[E2]) en la composición de la vacuna. Por el contrario, se demuestra abajo tal heterogeneidad en la proteína estructural E3 después de menos de cinco pasajes que eran muy inferiores (véase por ejemplo, el Ejemplo 3 - aunque
25 la mutación E168K estuvo presente después de tres pasajes, su

frecuencia fue solamente 18%).

Por consiguiente, en un aspecto la composición farmacéutica comprende (i) CHIKV-Δ5nsP3; y (ii) opcionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable; en donde al menos

5 30% de las partículas de CHIKV-Δ5nsP3 presentes en la composición expresan una proteína estructural E2 como se define por la secuencia de polipéptido de la SEQ ID NO: 2. En esta modalidad, al menos 30% de las partículas de CHIKV-Δ5nsP3 son no mutantes con respecto a la proteína estructural

10 E3, es decir, expresa la proteína estructural E3 de la SEQ ID NO: 2. En otras palabras, la frecuencia de la heterogeneidad de la secuencia (es decir, partículas CHIKV-Δ5nsP3 mutantes que expresan al menos una mutación en la proteína estructural E3 de la SEQ ID NO: 2) es 70% o menos. A menos que se

15 especifique de otro modo, cuando se refiere a "CHIKV-Δ5nsP3" o "partículas de CHIKV-Δ5nsP3" en general se pretende abarcar tanto formas mutantes como no mutantes de CHIKV-Δ5nsP3, es decir, CHIKV-Δ5nsP3 el cual expresa una proteína estructural E2 de la SEQ ID NO: 2 y CHIKV-Δ5nsP3 el cual expresa una

20 proteína estructural E2 que tiene una o más mutaciones en la SEQ ID NO: 2. En una modalidad, la proteína estructural E3 del CHIKV-Δ5nsP3 contiene no más de aproximadamente ten mutaciones de punto. En una modalidad, la proteína estructural E3 del CHIKV-Δ5nsP3 contiene no más de 9, 8, 7,

25 6, 5 o 4 mutaciones de punto. En una modalidad preferida, la

proteína estructural E3 del CHIKV-Δ5nsP3 contiene tres o menos mutaciones de punto, muy preferiblemente solamente una o dos mutaciones de punto.

En modalidades preferidas, al menos 35%, 40%, 45%,
5 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de las partículas de CHIKV-Δ5nsP3 presentes en la composición son no mutantes, es decir, expresan una proteína estructural E2 como se define por la secuencia de polipéptido de la SEQ ID NO: 2.

10 En un aspecto, la composición farmacéutica comprende (i) CHIKV-Δ5nsP3; y (ii) opcionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable; en donde menos de 70% de las partículas de CHIKV-Δ5nsP3 presentes en la composición expresan una proteína estructural E2 que tiene una o más
15 mutaciones con respecto a la secuencia de polipéptido de la SEQ ID NO: 2.

En un aspecto, la composición farmacéutica comprende (i) CHIKV-Δ5nsP3; y (ii) opcionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable; en donde menos de 70%
20 de las partículas de CHIKV-Δ5nsP3 presentes en la composición expresan una proteína estructural E2 que tiene la mutación E168K en la secuencia de polipéptido de la SEQ ID NO: 2.

En una modalidad preferida, las mutaciones (por ejemplo, la mutación E168K) en la proteína estructural E3
25 están presentes a una frecuencia de 70% o menos, por ejemplo,

menos de 70% de las partículas de CHIKV-Δ5nsP3 totales comprenden una o más mutaciones (o la mutación E168K) y 30% o más de las partículas de CHIKV-Δ5nsP3 totales expresan una proteína estructural E2 no mutada o una proteína estructural E2 que no comprende la mutación E168K.

En una modalidad preferida, menos de 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2% o 1% de las partículas de CHIKV-Δ5nsP3 presentes en la composición expresan una proteína estructural E2 que tiene una o más mutaciones (tales como, por ejemplo, E168K) con respecto a la secuencia de polipéptido de la SEQ ID NO: 2. Por ejemplo, la composición puede comprender 1-70%, 1-50%, 1-30%, 1-20%, 5-70%, 5-50%, 5-30%, 5-20%, 10-70%, 10-50%, 10-30% o 10-20% de partículas mutantes (es decir, partículas de CHIKV-Δ5nsP3 que expresan una proteína estructural E2 que tiene una o más mutaciones (tales como, por ejemplo, E168K) con respecto a la secuencia de polipéptido de la SEQ ID NO: 2), comparado con el número total de partículas de CHIKV-Δ5nsP3 (mutantes y no mutantes) presentes en la composición.

En una modalidad, las partículas de CHIKV-Δ5nsP3 que expresan una proteína estructural E2 que tienen una mutación E168K comprenden además una mutación la cual mitiga la pérdida de inmunogenicidad conferida por la mutación E168K. En una modalidad, la mutación está en la proteína nsP1, especialmente en el residuo A38. En una modalidad preferida,

las partículas de CHIKV- Δ 5nsP3 que expresan una proteína estructural E2 con una mutación E168K también expresan una nsP1 con una mutación A38S.

También se proporciona en la presente un proceso
5 para producir una composición farmacéutica de la invención, que comprende las etapas de 1) hacer crecer un virus CHIKV- Δ 5nsP3 en una línea de célula, y 2) minimizar la presencia de mutaciones de reducción de inmunogenicidad del virus CHIKV- Δ 5nsP3. En una modalidad, el virus CHIKV- Δ 5nsP3 inmunogénico
10 se propaga en una línea de células seleccionada a partir del grupo que consiste de una línea de células EB66, una línea de célula Vero, una línea de célula Vero- α His, una línea de célula HeLa, una línea de célula HeLa-S3, una línea de célula 293, una línea de célula PC12, una línea de célula CHO, una
15 línea de célula 3T3, una línea de célula PerC6, una línea de célula MDSK, una línea de célula fibroblasto embrionario de pollo, una línea de célula de pato y una línea de células de ave diploide. En algunas modalidades, tal línea de células es una línea de célula de pato. En algunas modalidades, tal
20 línea de células es una línea de célula de ave diploide. En algunas modalidades, tal línea de célula es una línea de célula EB66. En una modalidad preferida, tal línea de célula es una línea de célula Vero.

En una modalidad, la presencia de mutaciones de
25 reducción de inmunogenicidad se minimiza pasando CHIKV- Δ 5nsP3

menos de 5 veces, preferiblemente menos de 4 veces, preferiblemente menos de 3 veces, preferiblemente menos de 2 veces, más preferiblemente solamente una vez, muy preferiblemente a lo sumo 3 veces. Como se discute en la presente, los números de pasaje se refieren al número de pasajes *in vitro* después del rescate del virus (P0). En una modalidad preferida, el virus se pasa en células Vero. En un aspecto, el virus se hace crecer a una temperatura óptima. En una modalidad preferida, tal temperatura óptima es entre aproximadamente 28°C y 37°C, preferiblemente aproximadamente 35°C.

En una modalidad, el cultivo de célula hospedera es infectado con CHIKV-Δ5nsP3 a un MOI óptimo. En un aspecto, un MOI óptimo se define como un MOI bastante bajo como para no requerir cantidades excesivas de cultivo de banco de semilla del virus de trabajo, pero bastante alta para minimizar las mutaciones de reducción de inmunogenicidad como se describe en la presente. En un aspecto preferido, el MOI optimizado es un MOI de menos de 0.1, preferiblemente un MOI de entre aproximadamente 0.1 y 0.001, más preferiblemente un MOI de entre aproximadamente 0.09 a 0.0011, aún más preferiblemente un MOI de aproximadamente 0.05 a 0.005, muy preferiblemente un MOI de aproximadamente 0.01. En un aspecto, la confluencia de la célula hospedera se evalúa antes de la infección. En un aspecto, la confluencia de la célula hospedera es entre

aproximadamente 20 y 90%, preferiblemente entre
aproximadamente 30 y 75%, más preferiblemente entre
aproximadamente 40 y 60%, especialmente aproximadamente 50 a
60%. En un aspecto, el cultivo celular es infectado en un
5 punto de tiempo óptimo post-sembrado de célula hospedera; es
decir, entre el día 2 y día 5 después del sembrado de la
célula hospedera, preferiblemente a aproximadamente 4 días
después del sembrado de la célula hospedera. En un aspecto,
las partículas del virus son recolectadas entre el día uno y
10 día 6 después de la infección de la célula hospedera,
preferiblemente entre el día uno y día 4, preferiblemente en
el día o día 2 después de la infección de la célula
hospedera, preferiblemente en tanto el día uno y día 2
después de la infección de la célula hospedera.

15 En un aspecto, las mutaciones de reducción de
inmunogenicidad son mutaciones de punto en cualquier
ubicación en el genoma de CHIKV-Δ5nsP3 como se define por la
secuencia de polinucleótido de la SEQ ID NO: 1. En una
modalidad, las mutaciones de reducción de inmunogenicidad
20 están presentes en el genoma en una ubicación distinta de la
proteína E2. En una modalidad preferida, las mutaciones de
reducción de inmunogenicidad están localizadas en la proteína
E2, preferiblemente en residuos de aminoácidos 55 y/o 168,
por ejemplo, mutaciones G55R y/o E168K, especialmente E168K.
25 En algunas modalidades, las mutaciones de reducción de

inmunogenicidad como se describe en la presente son mitigadas o "rescatadas" por otras mutaciones en el genoma. En una modalidad, una mutación de mitigación de E168K es una mutación A38S de proteína 1 no estructural (nsP1).

5 En un aspecto, la frecuencia de la mutación E168K de la proteína E2 del CHIKV- Δ 5nsP3 es menos de 90%, menos de 80%, menos de 70%, menos de 60%, menos de 50%, menos de 40%, menos de 30%, menos de 20%, menos de 10%, preferiblemente menos de 50% en la combinación total de CHIKV- Δ 5nsP3
10 recolectado.

 En un aspecto, la invención actual proporciona un CHIKV- Δ 5nsP3 inmunogénico obtenible por el proceso proporcionado en la presente. En otro aspecto, la invención actual proporciona una composición farmacéutica que comprende
15 un CHIKV- Δ 5nsP3 inmunogénico obtenible por el proceso proporcionado en la presente.

 Aspectos de la invención proporcionan un uso del proceso descrito en la presente para manufacturar una composición para inmunización contra una infección del Virus
20 Chikungunya. En una modalidad preferida, la composición es una vacuna. En una modalidad, la vacuna es administrada al sujeto una vez, dos veces o tres o más veces. En un aspecto, las partículas virales de CHIKV- Δ 5nsP3 aisladas de sujetos inmunizados tienen un perfil de mutación de punto similar a
25 la composición de vacuna administrada, particularmente con

respecto a mutaciones de punto en la proteína estructural E3. En una modalidad, la vacuna es administrada una vez o dos veces. En una modalidad preferida, la vacuna es administrada solamente una vez; por ejemplo, una vacuna de un tiro. En un
5 aspecto, una vacunación de refuerzo es opcionalmente administrada. En ciertos aspectos preferidos, la composición farmacéutica es proporcionada en forma liofilizada.

Otros aspectos proporcionan composiciones que comprenden partículas de los virus obtenibles por el proceso
10 descrito en la presente para tratar y/o prevenir la infección del Virus Chikungunya. En un aspecto, las composiciones son para uso en un método para estimular una respuesta inmune en un sujeto y/o en un método para tratar o prevenir una infección del Virus Chikungunya. Como se usa en la presente,
15 el término "prevenir" también significa "proteger de". La infección de Virus Chikungunya en un aspecto puede ser causada por los genotipos Africano Occidental, Africano Oriental/Central/Sur (ECS) y/o Asiáticos del Virus Chikungunya.

20 Las preparaciones del virus producidas usando cualquiera de los procesos descritos en la presente pueden ser además sometidas a etapas de procesamiento adicionales, que incluyen etapas de filtración y/o liofilización adicionales. La preparación del virus puede ser sometida a
25 análisis para pureza de la preparación. Por ejemplo, las

preparaciones de virus pueden ser evaluadas para la presencia de impurezas y contaminantes, tales como, por ejemplo, ADN genómico de la célula hospedera, y/o proteínas de la célula hospedera. La pureza de una preparación del virus puede ser evaluada usando cualquier método conocido en la técnica, tal como cromatografía de exclusión de tamaño (SEC), densidad óptica a diferentes longitudes de onda, electroforesis en gel de proteína (por ejemplo, SDS-PAGE), Manchado Western, ELISA, PCR, y/o qPCR.

En algunas modalidades, la preparación del virus es evaluada para impurezas o contaminantes residuales. En algunas modalidades, la cantidad de impurezas o contaminantes residuales se compara con la cantidad de impurezas o contaminantes en una etapa temprana en el proceso de purificación, tal como, por ejemplo, directamente después de la recolección viral. En algunas modalidades, la reducción relativa de impurezas en la preparación de virus final es entre 60-95% con relación a la presencia de impurezas en una etapa temprana en el proceso de purificación. En algunas modalidades, la reducción relativa de impurezas en la preparación de virus final es aproximadamente 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, o 95%. En algunas modalidades, la preparación de virus final contiene menos de 5% impurezas o contaminantes. En

algunas modalidades, la preparación de virus final contiene menos de 5, 4, 3, 2, 1, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, o menos de 0.1% de impurezas. En una modalidad preferida, la preparación de virus final contiene menos de 1% de impurezas.

Cualquiera de los procesos descritos en la presente puede ser usado en la manufactura de una composición que comprende, virus purificado para administración a un sujeto. En algunas modalidades, el sujeto es un sujeto mamífero, tal como un animal humano o un no humano, que incluye ganado, mascotas, animales de compañía. En algunas modalidades, la composición es administrada a un sujeto en necesidad de inmunización contra el virus o virus similar como aquel de la preparación de virus. En algunas modalidades, las preparaciones de virus o composiciones que comprenden virus purificados usando los procesos descritos en la presente, son para tratar o prevenir infección con el virus o un virus similar como aquel de la preparación del virus. En una modalidad preferida, las preparaciones de virus o composiciones que comprenden virus purificados usando los procesos descritos en la presente son para tratar o prevenir una infección del Virus Chikungunya, particularmente una infección del Virus Chikungunya causada por los genotipos Africano Occidental, Africano Oriental/Central/Sur (ECS) y/o Asiáticos del Virus Chikungunya.

Las composiciones farmacéuticas de CHIKV-Δ5nsP3 o virus CHIKV-Δ5nsP3 purificados usando los procesos descritos en la presente, pueden ser administradas a un sujeto por cualquier ruta conocida en la técnica. En algunas 5 modalidades, las preparaciones o composiciones pueden ser administradas mediante rutas convencionales, tales como parenteralmente u oralmente. Como se usa en la presente, administración "parenteral" incluye, sin limitación, subcutánea, intracutánea, intradermal, intravenosa, 10 intramuscular, intraarticular, intraperitoneal, intratraqueal o por infusión.

A menos que se define de otro modo en la presente, los términos científicos y técnicos usados en conjunto con la presente descripción deben tener los significados que son 15 comúnmente entendidos por aquellos de habilidad ordinaria en la técnica. Además, a menos que se requiera por el contexto, los términos singulares deben incluir pluralidades y los términos plurales deben incluir el singular. Los métodos y técnicas de la presente descripción son en general realizados 20 de conformidad con métodos convencionales bien conocidos en la técnica. En general, las nomenclaturas usadas en conjunto con, y técnicas de bioquímica, enzimología, biología molecular y celular, microbiología, virología, cultivo de células o tejidos, genética y química de la proteína y 25 nucleica descrita en la presente, son aquellas bien conocidas

y comúnmente usadas en la técnica. Los métodos y técnicas de la presente descripción son en general realizados de conformidad con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describen en varias referencias generales y más específicas que son mencionadas y discutidas a través de la presente especificación a menos que se indique de otro modo.

Tabla A-1. Abreviaturas

Abreviatura	Definición	Abreviatura	Definición
CHIKV	Virus Chikungunya	MVSB o P1-MVSB	Banco de semilla del virus principal (Pasaje 1 después del rescate)
CHIKV-Δ5nsP3	CHIKV con una mutación de supresión definida en nsP3 (SEQ ID NO: 1)	WVSB o P2-WVSB	Banco de semilla del virus de trabajo (Pasaje 2 después del rescate)
ECSA	Africano oriental-central sur East-central	VRP	Partícula de replicón del virus
Proteínas E (1, 2, 3)	Proteínas de envoltura	TCID ₅₀	Dosis infectiva del cultivo de tejidos
Proteína C	Proteína cápsida	LR-VRP	VRP con base en el aislado CHIKV de La Reunion
Proteína 6K	Proteína de 6 kilodalton	BHK(-21)	Células renales de hámster bebé

5	nsP	Proteína no estructural	MOI	Multiplicidad de infección
	MEM	Medio esencial mínimo	M	Millón
	EMEM	MEM de Eagle	T75, T150, T175	Matraz T 75, 150, 175 cm ²
	FBS	Suero bovino fetal	RB850	Botella Rodante de 850 cm ²
10	PBS	Salina amortiguada de fosfato	Prob.F	Probabilidad como se determina por la prueba F en análisis de varianza de una vía
15	Pfu	Unidad que forma placa	ANOVA	Análisis de varianza
	PRNT	Prueba de neutralización de reducción de placa	DS	Sustancia de fármaco
	NGS	Secuenciamiento de próxima generación	GLuc	Luciferasa Gaussia
20	h	hora	GMP	Práctica de buena manufacturación
	d	Día	R&D	Investigación y desarrollo
	AA	aminoácido	SEC	Cromatografía de exclusión de tamaño
25	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa	SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida-

5				dodecilsulfato de sodio
	qPCR	PCR Cuantitativa	ELISA	Ensayo inmunosorbente ligado a la enzima
	s.c.	Subcutánea	p/p	Peso/peso
	TSE	Encefalopatía espingoforme transmisible	mL	mililitro
10	p.i.	Post-infección	CPE	Efecto citopático
15	PP	Polipropileno	V	Volts
	µF	Micro-Farad	mM	milimolar
	µm	micrómetro	TBS	Salina amortiguada con Tris
	kDa	Kilodalton	NaCl	Cloruro de sodio
20	mg	miligramo	LR2006-OPY1	Aislado de CHIKV La Reunion
	ARN	Ácido ribonucleico	D-PBS	Salina amortiguada de fosfato Dulbecco
	Anti-anti	Antibiótico-antimicótico	RPM	Rotaciones por minuto
	SINV	Virus Sindbis	RRV	Virus del rio Ross
25	SFV	Virus del Bosque Semliki	MCB	Banco de células principales
	WHO	Organización	ATCC	Colección de

	Mundial de la Salud		Cultivo Tipo Americano
--	---------------------	--	------------------------

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Ensayos iniciales para producción de sustancia de fármaco de CHIKV-Δ5nsP3 (DS)

Ensamble de genoma de CHIKV-Δ5nsP3 sintetizado

El genoma del virus CHIKV-Δ5nsP3 se sintetizó en cinco fragmentos en MWG Eurofins (Germany) y se ensambló completamente en el plásmido pMA (vector pMX con resistencia a ampicilina), un vector de clonación estándar. El esqueleto del vector pMX se muestra en la **Figura 1**. Todos los procedimientos de preparación de plásmido y clonación se llevaron a cabo bajo condiciones libres de TSE usando células *E. coli* de NEB10β electro-competentes. La estrategia de clonación usada para el ensamble completo del genoma de CHIKV-Δ5nsP3 en pMA se resume en la **Fig. 3B**. Brevemente, el plásmido de pMA que contiene el fragmento 1, el cual cubre a nsP1 y parte de nsP2 (como se muestra en la **Fig. 3A**), se linearizó mediante digestión de restricción de *EcoRI/PacI* y el fragmento 2 que cubre partes de nsP2 y nsP3 se fusionó al fragmento 1. En paralelo, el fragmento 3 (que cubre nsP4 y C) se fusionó al fragmento 4 (cubriendo C y E2) mediante clonación *ClaI/PacI*. En una tercera etapa de clonación, los fragmentos 3 y 4 se clonaron mediante *AgeI/XhoI* y el

fragmento 5 mediante *XhoI/PacI* en el *AgeI/PacI* - pMA linealizado que ya contiene los fragmentos 1 y 2. La clonación resultó en el vector pMA_CHIKV-Δ5nsP3 que codifica a CHIKV-Δ5nsP3, como se verifica por secuenciamiento.

5 *Rescate de CHIKV-Δ5nsP3 a partir de células Vero ("recate del virus")*

Para la producción de partículas del virus CHIKV-Δ5nsP3 a partir del vector pMA_CHIKV-Δ5nsP3 diseñado por ingeniería genética en células Vero (rescate del virus), el
10 plásmido pMA_CHIKV-Δ5nsP3 se linealizó por digestión de restricción *NotI* y se sometieron a transcripción *in vitro* usando el Kit mMessage mMachine de Ambion (AM130). La integridad del ARN se confirmó mediante electroforesis de gel (no mostrada). En paralelo, las células Vero se prepararon
15 por electroporación con ARN viral. Brevemente, las células Vero se desprendieron de los matraces de cultivo celular usando TrypLESelect (Gibco) y se lavaron dos veces con PBS. Todas las etapas de centrifugación se realizaron a 300g a temperatura ambiente. El ARN viral se mezcló con 8×10^6
20 células Vero en 800 μ l de PBS y la mezcla de células Vero/ARN se transfirió en vasos de precipitado de electroporación de 0.4 cm. Se realizaron dos pulsos a 850 V, 25 μ F, 200 Ohm. Después de la electroporación, las células Vero se mantuvieron a temperatura ambiente por 10 minutos y
25 finalmente se resuspendieron en MEM/5% de FCS/1% de

Antibiótico-Antimicótico (Anti-Anti)/2 mM de L-Glutamina e incubo en matraces T75 por 48 horas a 35°C/5% de CO₂. El sobrenadante de cultivo celular que contiene CHIKV-Δ5nsP3 rescatado (pasaje 0; P0) se recolectó y centrifugó a 3,000g por 10 minutos a 4°C. El titulador del virus se determinó por placa y el ensayo TCID₅₀ en células Vero. El CHIKV-Δ5nsP3 (P0) rescatado se almacenó a -80°C. La estructura genómica del candidato de vacuna del virus CHIKV-Δ5nsP3 obtenido, también referido como VLA1553, se muestra en la **Figura 2**.

10 *Verificación de la secuencia CHIKV-Δ5nsP3*

Con el fin de verificar la secuencia de genoma viral, los ácidos nucleicos virales se extrajeron a partir del sobrenadante del cultivo de células recolectadas usando el Kit de Centrifugación del Virus QIAamp MinElute (QIAGEN #57704) y se hizo síntesis de ADN usando el Sistema de Síntesis de Primera Hebra SuperScript III (Life Technologies, Catalog# 18080-051) usando hexámeros aleatorios. El PCR con Polimerasa de Alta Fidelidad Phusion se realizó con cebadores amplificando regiones traslapantes del genoma CHIKV-Δ5nsP3, y los productos de PCR se sometieron a secuenciamiento Sanger en MWG Eurofins, Germany. Las secuencias de los pares de cebadores usados para PCR y secuenciamiento se muestran en la **Tabla 1**

Tabla 1. Pares cebadores usados para
5 secuenciación del genoma CHIKV-Δ5nsP3.

Par Cebador	Sitios de restricción de secuencia cebadora delantera (5'-3') (minúsculas)	SEQ ID NO:	Sitios de restricción de secuencia cebadora inversa (5'-3') (minúsculas)	SEQ ID NO:
1	ttaggatccGATGGCTGC GTGAGACAC	8	taactcgagCCGTCAGGTC TGTGAACAT	9
2	ttaggatccTACCACCAG GCGATTAAAG	10	taactcgagCTTGCCAC TTACTGAAGG	11
3	ttaggatccTGCTACAGA AGTCACGCC	12	taactcgagGCCAAAGCGT GAATCAG	13
4	ttaggatccAACAGCTTG AGGACAGAGCG	14	taactcgagCTCTGTCTCA TCACGTCGG	15
5	ttaggatccAAATTGCAG TCATAGGAGTCTTC	16	taactcgagAGTACGTTGA CGTGCTCTGA	17
6	ttaggatccGTGGGTAA ACAACGCAAA	18	taactcgagGGTTAAAGTC TTCTATCCTCCTGG	19
7	ttaggatccGGATAACCA CTGGGATAATAGG	20	taactcgagAGTTGTGAAA TTCCTTCTGCC	21
8	ttaggatccCGCAGATAG AACCAGTGAAC	22	taactcgagCAGCAGCTCT ACTTGGGTC	23
9	ttaggatccAGGAGGGAA	24	taactcgagCCCTCGCCTT	25

Par Cebador	Sitios de restricción de secuencia cebadora delantera (5'-3') (minúsculas)		Sitios de restricción de secuencia cebadora inversa (5'-3') (minúsculas)	
	SEQ ID NO:		SEQ ID NO:	
5		AGACAGGCT		CTTCTG
	10	ttaggatccAAAATAGA AGGAGTGCAAAAAG	26	taactcgagCCTGGAGTTT CTTAAGTAATAGTTGC
	11	ttaggatccACCGGTCCA GGTCATTTA	28	taactcgagGCAGCAAATT CTTCCCAG
10	12	ttaggatccCCATTCCAG AACACACTACAG	30	taactcgagATACCTGATT TCATCATGGC
	13	ttaggatccCCTTTGATA AGAGCCAAGATG	32	taactcgagTACAAAGTTA TGACGGGTCCT
	14	ttaggatccCAACGAACA GGGCTAATTG	34	taactcgagGACCGCTTAA AGGCCAG
15	15	ttaggatccGTGCATGAA AATCGAAAATG	36	taactcgagTGGTCTTGTTG GCTTTATAGACA
	16	ttaggatccAACCGGAGG AAACCCTAC	38	taactcgagGTACCGCACC GTCTGG
	17	ttaggatccAGCTACCTT GCAGCACGT	40	taactcgagCCCACCATCG ACAGG
20	18	ttaggatccCGAGCCGTA TAAGTATTGGC	42	taactcgagCGCCGGTGAA GACCTTAC
	19	ttaggatccACTACTGTC AGTCACTTTGGAGC	44	taactcgagTACCGGGTTT GTTGCTATTT
	20	ttaggatccCACAACCTGG	46	taactcgagGCGTAGCCCT
25				

Par Cebador	Sitios de restricción de secuencia cebadora delantera (5'-3') (minúsculas)	SEQ ID NO:	Sitios de restricción de secuencia cebadora inversa (5'-3') (minúsculas)	SEQ ID NO:
	TACTGCAGAGAC		TTGATCTATAG	
21	ttaggatccGGTGCTATG CGTGTCGT	48	taactcgagATCTCCTACG TCCCTGTGGG	49

Pasaje de CHIKV-Δ5nsP3 en células Vero

Después del rescate de CHIKV-Δ5nsP3, se infectaron células Vero y el virus se pasó serialmente en tres réplicas (véase **Tabla 2**). Para el pasaje, células Vero se sembraron en matraces de T150 y se hicieron crecer a confluencia (1-3 días) se lavaron dos veces con DPBS 1x antes de la adición de 20 mL de medio de infección (EMEM p/o de suero). Se agregó el inóculo directamente al matraz en el volumen indicado y las células se incubaron por 24h a 35°C, 5% de CO₂. Se hizo el pasaje en tres réplicas (A, B y C) con infección de células Vero a un MOI de 0.01 para el primer pasaje del rescate del virus (P0). Los 20 mL recolectados se transfirieron a un tubo de PP de 50 mL 24 h p.i., los desechos celulares se removieron por centrifugación (3000g, 10 min) y el sobrenadante se transfirió a un tubo de PP de 50 mL fresco. Una solución de sacarosa al 49% (p/p) se agregó a una concentración final de 10% (p/p) y 1 mL de alícuotas de los recolectado estabilizado se almacenó a ≤ -70°C.

Las fracciones subsecuentes se llevaron a cabo con recolección sin sacarosa. Las infecciones se llevaron a cabo usando diferentes volúmenes de la recolección las cuales fueron aproximadamente calculadas con base en el efecto
5 citopático observado en el pasaje previo y en réplicas paralelas. Los volúmenes de lo recolectado se usaron para infección variada entre 5 μ L y 1 mL. Las infecciones se siguieron por una recolección única después de 24h. Se observa que el MOI usado para producción de 2-16 pasajes se
10 determinó retrospectivamente después que los resultados de TCID₅₀ estuvieron disponibles, resultando en un intervalo amplio ("no controlado) de MOIs a través del experimento (Véase **Tabla 2**). Este procedimiento se realizó hasta 16 pasajes en los tres réplicas paralelos (réplicas A, B y C)
15 permitiendo la observación sistemática de varios parámetros durante la adaptación de CHIKV- Δ 5nsP3 a pasaje de células Vero. Durante este experimento, se registraron el rendimiento (TCID₅₀/mL), volumen de infección, número de células Vero por matraz, el número de pasaje de células Vero y efecto
20 citopático (CPE). La multiplicidad de infección (MOI) se determinó retrospectivamente con base en el TCID₅₀ medido y también se registró. Los pasajes CHIKV- Δ 5nsP3 se evaluaron simultáneamente por tamaño de placa en las tres réplicas.

Tabla 2. Pasaje serial de CHIKV- Δ 5nsP3 en células Vero después del rescate de virus, realizado por triplicado.
25

Los datos mostrados incluyen rendimiento de recolección (24h; TCID₅₀), volumen de infección (mL), números de células/matrices, número de pasaje de células Vero, multiplicidad de infección (MOI) y efecto citopático observado (CPE) a 24 h post-infección.

Réplica A						
Pasaje	TCID₅₀/mL	Infección (mL)	Células @T150	Pasaje Vero	MOI (TCID₅₀)	CPE @ 24h
P0	9.77E+06					n.a.
P1A	2.59E+07	0.02	2.00E+07	149	0.010	50
P2A	1.90E+07	1	2.90E+07	149	0.893	50
P3A	2.92E+07	0.1	2.80E+07	149	0.068	20
P4A	2.14E+08	0.37	2.00E+07	150	0.540	90
P5A	1.01E+08	0.1	2.70E+07	150	0.792	60
P6A	3.50E+08	0.1	2.60E+07	150	0.390	60
P7A	7.43E+08	0.037	1.30E+07	151	0.997	50
P8A	8.02E+08	0.05	1.60E+07	151	2.323	90
P9A	1.51E+09	0.01	2.40E+07	151	0.334	60
P10A	3.60E+09	0.005	1.98E+07	152	0.381	80
P11A	1.88E+09	0.005	1.84E+07	152	0.982	90
P12A	6.94E+08	0.005	1.30E+07	152	0.724	90
P13A	4.22E+09	0.01	1.44E+07	153	0.482	60
P14A	3.05E+09	0.01	1.90E+07	153	2.219	90
P15A	3.03E+09	0.01	2.20E+07	153	1.384	90
P16A	2.91E+09	0.01	1.70E+07	154	1.781	90
Réplica B						
Pasaje	TCID₅₀/mL	Infección (mL)	Células @T150	Pasaje Vero	MOI (TCID₅₀)	CPE @ 24h

5	P0	9.77E+06				n.a.
	P1b	6.47E+07	0.02	2.00E+07	149	0.010
	P2B	5.32E+07	1	2.90E+07	149	2.232
	P3B	2.27E+07	0.1	2.80E+07	149	0.190
	P4B	1.65E+08	0.08	2.00E+07	150	0.091
	P5B	1.65E+08	0.1	2.70E+07	150	0.613
	P6B	4.06E+08	0.1	2.60E+07	150	0.636
	P7B	9.19E+08	0.092	1.30E+07	151	2.875
	P8B	7.43E+08	0.1	1.60E+07	151	5.744
	P9B	2.14E+09	0.025	2.40E+07	151	0.774
	P10B	4.06E+09	0.01	1.98E+07	152	1.080
	P11B	2.09E+09	0.01	1.84E+07	152	2.214
	P12B	8.76E+08	0.01	1.30E+07	152	1.608
	P13B	2.91E+09	0.01	1.44E+07	153	0.609
	P14B	4.22E+09	0.01	1.90E+07	153	1.530
	P15B	3.79E+09	0.01	2.20E+07	153	1.917
	P16B	3.79E+09	0.01	1.70E+07	154	2.232
15	Réplica C					
	Pasaje	TCID₅₀/mL	Infección (mL)	Células @T150	Pasaje Vero	MOI (TCID₅₀)
	P0	9.77E+06				n.a.
	P1C	3.24E+07	0.02	2.00E+07	149	0.010
	P2C	3.29E+07	1	2.90E+07	149	1.117
	P3C	2.54E+07	0.1	2.80E+07	149	0.118
	P4C	1.29E+08	0.15	2.00E+07	150	0.191
	P5C	4.13E+08	0.1	2.70E+07	150	0.477
	P6C	5.91E+08	0.1	2.60E+07	150	1.587
	P7C	1.85E+09	0.185	1.30E+07	151	8.415
	P8C	4.83E+08	0.2	1.60E+07	151	23.073
	P9C	1.03E+09	0.1	2.40E+07	151	2.013
	P10C	5.14E+09	0.015	1.98E+07	152	0.783
20						
25						

	P11C	1.51E+09	0.015	1.84E+07	152	4.205	90
	P12C	1.15E+09	0.015	1.30E+07	152	1.738	90
	P13C	4.22E+09	0.01	1.44E+07	153	0.802	65
	P14C	3.81E+09	0.01	1.90E+07	153	2.219	90
	P15C	1.07E+09	0.01	2.20E+07	153	1.730	90
5	P16C	2.48E+09	0.01	1.70E+07	154	0.631	90

Tendencias observadas durante el pasaje serial bajo condiciones MOI "no controladas"

10 Durante la adaptación de CHIKV-Δ5nsP3 a pasaje de células Vero, se observó que el virus CHIKV-Δ5nsP3 total incrementó el rendimiento sustancialmente con número de pasaje incrementado en células Vero como se muestra en la **Tabla 2**. Como se muestra en la **Figura 4A**, el pasaje 6 y anterior proporcionan un incremento de aproximadamente 100 veces en titulador comparado con el rescate del virus (P0) y pasajes tempranos. También se observó una reducción concomitante en el tamaño de la placa de CHIKV-Δ5nsP3 (**Figura 4B**). El efecto de pasaje *in vitro* del virus Chikungunya de tipo silvestre en el tamaño de la placa en otras líneas de células ha sido previamente descrito por Gardner CL, *et al.* (Gardner CL, *et al.*, 2014, *supra*). Un alto rendimiento de virus podría ser altamente deseable para la producción industrial del virus inactivado; sin embargo, también se observó aquí que el CHIKV-Δ5nsP3 llegó a ser menos

15

20

25

inmunogénico con pasaje incrementado como se muestra en la **Figura 4C**. Brevemente, para determinar la inmunogenicidad de diferentes pasajes de CHIKV-Δ5nsP3 como se generan en la **Tabla 2**, anterior, los grupos de cinco ratones C57Bl/6 se

5 inmunizaron una vez subcutáneamente con una dosis de 10^5 TCID₅₀ CHIKV-Δ5nsP3 pasaje 5 (P5B), pasaje 8 (P8B) o P15 (P15C). El CHIKV-Δ5nsP3 en P0 (rescate del virus), también a 10^5 TCID₅₀, se usó como un control positivo. El día 21 combinaciones de suero se evaluaron por su capacidad para

10 neutralizar a CHIKV-Δ5nsP3 (P0) en un ensayo PRNT en células Vero, probando diluciones de suero seriales de 4-partes que varían desde 1:20 hasta 1:327,680. Como se muestran en la **Figura 4C**, la inmunogenicidad en ratones CHIKV-Δ5nsP3 P5B mostró ligeramente inmunogenicidad cambiada comparado con el

15 CHIKV-Δ5nsP3 no pasadas (P0), mientras un virus P8B mostró inmunogenicidad sustancialmente reducida comparable con el virus P15C. (Como el virus P15C no fue inmunogénico, se observó como un control negativo en ensayos PRNT subsecuentes). Finalmente, los pasajes seleccionados del

20 CHIKV-Δ5nsP3 se probaron por estabilidad genética por secuenciamiento de Sanger. Después del pasaje de CHIKV-Δ5nsP3 en células Vero hasta 16 veces, se verificó que la supresión de 60 aminoácidos en el gen nsP3 responsable de la atenuación del virus fue genéticamente estable, indicando que el virus

25 no revierte nuevamente al tipo silvestre, una consideración

de seguridad importante para vacunas atenuadas vivas.

Tendencias observadas durante el pasaje serial bajo condiciones MPI controladas

El uso de MOIs altos (por ejemplo, superior de 0.1) no es propicio para un proceso a escala industrial ya que se necesita también mucho material de partida. En este sentido, se probó el uso de un MOI inferior (0.01) sobre tres pasajes y se determinó la inmunogenicidad de los pasajes resultantes. Como se muestra en la **Figura 5A**, tres pasajes de la Réplica B en la **Tabla 2**, se pasaron bajo condiciones controladas, con MOIs que varían desde 0.01 hasta 2.23. A partir del pasaje 3 de este modo obtenido 3 (P3B), se hicieron pasajes adicionales hasta P6 usando un MOI de 0.01 para cada pasaje y como se muestra como "condiciones controladas en MOI 0.01" en la **Fig. 5A**. Bajo condiciones usando un MOI de 0.01, la inmunogenicidad del virus resultante se perdió muy rápidamente como se muestra en la **Fig. 5B**. Por el pasaje 5, el CHIKV-Δ5nsP3 se proporcionó no inmunogénico. Este resultado fue contrario a los resultados vistos con P5B en la **Figura 4C**, el cual se produjo con un MOI muy superior (véase **Tabla 2**, Réplica B) y fue todavía inmunogénico. Esta observación parece indicar que el MOI inferior conduce a selección más rápida durante el pasaje de células Vero para mutaciones que afectan la inmunogenicidad de CHIKV-Δ5nsP3.

Ejemplo 2. Definición de heterogeneidades de

secuencia de CHIKV-Δ5nsP3 lo cual afecta la inmunogenicidad

Debido a las reducciones/pérdidas observadas de inmunogeneidad (titulador de anticuerpo neutralizante) y tamaño de placa reducida a pasajes CHIKV-Δ5nsP3 superior, fue de interés analizar las heterogeneidades de secuencia posible dentro de las poblaciones virales a diferentes números de pasajes. En adición, fue de interés analizar la secuencia de placas individuales de la población viral. Los CHIKV-Δ5nsP3 (P0) no pasados no mostraron heterogeneidades de secuencia con base en el secuenciamiento Sanger. En general, con números de pasaje incrementados, se observó un aumento en las heterogeneidades de secuencia para todas las 3 réplicas (Réplicas A, B y C; **Tabla 3**). En el caso de pasar la réplica C en el pasaje 8 (P8C), la población del virus fue todavía heterogénea (heterogeneidades de secuencia se muestran en la **Tabla 3**), mientras el pasaje P15C muestra una población de virus más homogénea con mutaciones de punto definidas (indicadas por *). Los datos de inmunogenicidad mostrados en la **Figura 4C** (Ejemplo 1, anterior) se enfocan en P5B y P8B, lo cual muestra heterogeneidades de secuencia en las proteínas no estructurales CHIKV-Δ5nsP3 (nsP) y proteína de envoltura E2 como se muestra en la **Tabla 3** abajo.

Tabla 3. Heterogeneidades de secuencia en CHIKV-Δ5nsP3 en los pasajes P5, P8 y P15 (Réplicas A, B y C como se producen en la Tabla 2). Las heterogeneidades de secuencia se

determinaron por secuenciamiento Sanger. Para tal propósito, los ácidos virales nucleico se extrajeron de sobrenadante de cultivo de células recolectadas usando el Kit de Centrifugación de Virus QIAamp MinElute (Qiagen). El ADNc se sintetizó usando el Sistema de Síntesis de Primera Hebra SuperScript III (ThermoFischer) usando hexámeros aleatorios. La PCR con Polimerizada de Alta Fidelidad Phusion se realizó con cebadores amplificando regiones traslapantes del genoma CHIKV-Δ5nsP3 (**Tabla 1**), los cuales fueron secuenciadas por secuenciamiento Sanger en MWG Eurofins, Germany. Los resultados muestran lecturas de las llamadas base automatizadas (>20%) así como también las heterogeneidades detectadas por análisis visuales de cromatogramas de secuenciamiento. *Mutaciones completas (es decir, 100%) están indicadas por un asterisco.

15

20

25

	Réplica A			Réplica B			Réplica C		
Gen	P5A	P8A	P15A	P5B	P8B	P15B	P5C	P8C	P15C
	Heterogeneidades de Secuenciamiento								
nsP2						L494I			
		G577W	G577W		G577W	G577W		G577W	G577W*
						G621R			
nsP3					R470S	R470S			
nsP4					V113I				
E2		G55R	G55R		G55R	G55R	G55R	G55R	G55R*
					H99Y	H99Y			
	E168K			E168K	E168K	E168K			
			M171V						

		T230I	T230I		T230I	T230I		T230I	T230I★
		H232Y	H232Y						
	E247K						E247K		
		E247D			E247D			E247D	
	A423A			A423A					

5

*Expansión y secuenciamiento de placas CHIKV-Δ5nsP3
únicas*

Para entender el efecto de mutaciones individuales en inmunogenicidad y consecuentemente desarrollar un proceso de producción controlado y reproducible para una vacuna

10 de producción controlado y reproducible para una vacuna CHIKV-Δ5nsP3 altamente inmunogénica, placas individuales de P5B y P8B aislados de CHIKV-Δ5nsP3 se escogieron. Brevemente, diluciones seriales de CHIKV-Δ5nsP3 P5B y P8B se usaron para infección de células Vero en un ensayo de placa (descrito

15 bajo la **Figura 4**) y después de una incubación de 72 horas, placas únicas de diferentes morfologías se escogieron (las placas pequeñas fueron preferiblemente escogidas, puesto que comienzan a aparecer después de varios pasajes en células Vero) y se expandieron mediante re-infección de células Vero

20 (5x10⁵) en placas de 6 cavidades. Las diferentes muestras de CHIKV-Δ5nsP3 que se derivan de placas únicas se seleccionaron con base en las mutaciones en la secuencia del gen E2 previo a una expansión adicional en células Vero. Los clones P5B-02, P5B-03, P5B-04, P5B-07, P5B-11, P8B-01 y P8B-05 se

25 expandieron y purificaron para experimentos de

inmunogenicidad *in vivo*. Las placas individuales se expandieron en células Vero que crecen en Botellas Rodantes usando una Botella Rodante de 850cm² única con superficie CellBIND para cada aislado. Después de alcanzar la confluencia, las células se lavaron dos veces con 100mL de D-PBS + Ca⁺ Mg antes de que se agregaran 100 mL de medio de infección (EMEM p/o en suero) que contiene el inóculo en un MOI de 0.01 y las células se incubaron por 24h a 35°C, 5% de CO₂. Los 100 mL recolectados se transfirieron a 50 mL de tubos PP 24h p.i y los desechos celulares se removieron por centrifugación, seguido por una filtración de 0.2µm usando dispositivos de filtración a vacío Steriflip® (Merck). Las recolecciones del virus clarificado individuales se concentraron primero usando dispositivos de Filtro Centrífugos Amicon®, se diafiltraron a amortiguador TBS y purificaron por sulfato de protamina y tratamiento con Capto™ Core700. Los clones CHIKV-Δ5nsP3 purificados entonces se usaron para estudios adicionales.

Las secuencias de genoma completo de las muestras CHIKV-Δ5nsP3 expandidas, P5B+1 y P8B+1; es decir P5B-02, P5B-03, P5B-04, P5B-07, P5B-11, P8B-01 y P8B-05 como se describe anteriormente, derivado de placas únicas, P5B y P8B, respectivamente, se evaluaron por secuenciamiento Sanger. Las mutaciones de punto observadas de las placas individuales se resumen en la **Tabla 4** y las secuencias genómicas esquemáticas

se muestran en las **Figuras 6B y 6D.**

Con el fin de evaluar el efecto de mutaciones de punto específicas en la inmunogenicidad de CHIKV- Δ 5nsP3, suero de ratón de 19 días a partir de ratones inmunizados con los virus derivados de la placa individual se generaron y analizaron en PRNT. Brevemente, una dosis única de CHIKV- Δ 5nsP3 a una dosis propuesta de TCID₅₀ de 10^5 se administró subcutáneamente a ratones C57Bl/6 (10 por grupo de tratamiento) y combinaciones de suero de 19 días se analizaron en un ensayo PRNT en diluciones seriales de 4 partes que varían desde 1:20 hasta 1:327,680 por su capacidad de neutralización de virus. El virus que se neutralizó en PRNT corresponde a un pasaje 2 de CHIKV- Δ 5nsP3 (P2, 560 pfu/ml) el cual no muestra las heterogeneidades de secuencia y por lo tanto fue idéntico en secuencia al CHIKV- Δ 5nsP3 sin pasaje (P0). La mezcla de neutralización (560 pfu/ml de CHIKV- Δ 5nsP3 P2 y diluciones de suero seriales) se incubó por 1 hora a temperatura ambiente y se agregó a células Vero, seguido por incubación por 2 horas. Finalmente, se agregó un revestimiento de metilcelulosa (0.8%) seguido por incubación por 72 horas. La lectura de la placa se hizo después del teñido de violeta de cristal (0.5% de violeta de cristal en 5% de Formaldehído).

Tabla 4. Mutaciones en placas escogidas únicas de pasajes de CHIKV- Δ 5nsP3 P5 y P8. Secuenciamiento del genoma

CHIKV- Δ 5nsP3 completo se realizó a MWG Eurofins, Germany, usando los cebadores en la **Tabla 1**. Todos los clones P5B y P8B corresponden a CHIKV- Δ 5nsP3 P6 (P5B+1) y P9 (P8+1), respectivamente, expandido en células Vero. Los tituladores PRNT₅₀ se calcularon en GraphPad Prism usando cálculos de 3 parámetros de ajuste no lineal. La proteína viral en la cual las mutaciones de punto respectivas se identificaron como se muestra en paréntesis. Los valores PRNT₅₀ para aislados no inmunogénicos no fueron medibles como se indica.

Experimento #	Aislado	Pasaje	Mutación(es) de punto	Inmunogenicidad	PRNT ₅₀
4399gr1	P0 #1	0	N/A	Control positivo	386
4415gr1	P0 #2	0	N/A	Control positivo	4215
4415gr2	P5B-02	5+1	E168K[E2]+A38S[nsP1]	retenido	373
4415gr3	P5B-03	5+1	H232Y[E2]	retenido	112
4415gr4	P5B-04	5+1	E168K[E2]	pérdida	-
4415gr5	P5B-07	5+1	E168K[E2]	pérdida	-
4415gr6	P5B-11	5+1	E247K[E2]	retenida	219
4415gr7	P8B-01	8+1	H99Y/E168K[E2]+R470S[nsP3]	pérdida	-
4415gr8	P8B-05	8+1	G55R/H232Y[E2]+G577W[nsP2]	pérdida	-

4399gr2	P15C- DS	15	G55R/T230I[E2]+G577W[nsP2]	Control negativo	-
---------	-------------	----	--------------------------------	---------------------	---

- = no medible

5 Como se puede ver en la **Figura 6A**, la
inmunogenicidad de CHIKV-Δ5nsP3 P5B-11 y P5B-03, ambos con
mutaciones de punto único en la proteína E2, E247K y H232Y
(**Figura 6B**), respectivamente, no son afectados cuando se
comparan con la inmunogenicidad de P0 CHIKV-Δ5nsP3. La
10 capacidad de neutralización del suero P0 se muestra a partir
de dos experimentos de ratón independientes (4415; P0 #2 y
4399; P0 #1) delineando el intervalo aceptable de
inmunogenicidad. Por otro lado, P8B-05, caracterizado por
mutaciones de 3 puntos, G577W, G55R y H232Y en nsP2 y E2,
15 respectivamente, es no inmunogénico en ratones. La mutación
G55R fue ya descrita en la literatura por Gardner CL, *et al.*,
como es un resultado de pasaje de CHIKV *in vitro*. La
partícula viral es afectada por una dependencia incrementada
de unión de heparan sulfato *in vitro* lo cual conduce a un
20 atenuación *in vivo* (Gardner CL, *et al.*, 2014, *supra*).

25 Como se puede ver en la **Figura 6C**, solamente una de
las cuatro muestras de CHIKV-Δ5nsP3 derivada a partir de
placas únicas (P5B-02) fue todavía inmunogénica y se
caracterizó por dos mutaciones de punto, A38S y E168K en nsP1
y E2 (**Figura 6D**), respectivamente. También, P8B-01 con tres

mutaciones de punto, R470S en el nsP3 y H99Y y E168K en la proteína E2, fue no inmunogénico en ratones y fue comparable con el control negativo P15C. P5B-04 y P5B-07 cada una tiene mutaciones de punto único en E2, es decir, el ácido glutámico
5 168 se mutó a una Lisina (E168K), la cual también se mostró por tener un efecto directo en inmunogenicidad, puesto que se perdió la capacidad de neutralización de CHIKV-Δ5nsP3 único.

En resumen, se observa que muchas de las mutaciones que se originan durante el pasaje en células Vero se
10 localizaron en la proteína E2. Algunas de las mutaciones de punto identificadas en la proteína E2 y/u otras partes del genoma no afectan sustancialmente la inmunogenicidad del virus; particularmente las mutaciones H232Y[E2] y E247K[E2]. Sin embargo, algunas de las otras mutaciones identificadas en
15 CHIKV-Δ5nsP3 resultaron en pérdida de inmunogenicidad; particularmente la mutación que frecuentemente ocurre E168K[E2], sean solos o en combinación con otras mutaciones. Una excepción interesante fue el mutante con mutaciones tanto E168K[E2] como A38S[nsP1], las cuales mantienen la
20 inmunogenicidad. Esta observación sugiere que la mutación A38S[nsP1] tiene un efecto mitigante en la inmunogenicidad reducida conferida por la mutación E168K[E2]. Además, un aislado con mutaciones G55R/H232Y[E2] Y G577W[nsP2] también demuestra pobre inmunogenicidad, quizás principalmente debido
25 a la mutación G55R en E2, ya que la mutación H232Y solo tiene

poco efecto (véase P5B-03).

Las mutaciones E168K y G55R en la proteína E2 del virus Chikungunya fueron previamente descritas como confiriendo carga de superficie positiva incrementada, conduciendo a interacción incrementada con heparan sulfato y/u otros glicosaminoglicanos (GAGs), finalmente resultando en infectividad específica incrementada. En el antecedente de CHIKV de tipo silvestre, las mutaciones se mostraron por causar un tamaño de placa más pequeño, debido a dispersión inferior en placas mediadas por unión a heparan sulfato. Además, las mutaciones resultaron en atenuación de CHIKV en un modelo de ratón de enfermedad musculoesquelética (MSD), con dispersión incrementada en ratones a órganos y de este modo niveles inferiores de viremia (Gardner CL, et al., 2014, *supra*; Silva LA, et al., A single-amino-acid polymorphism in Chikungunya virus E2 glycoprotein influences glycosaminoglycan utilization (2014) J Virol.; 88(5):2385-97). El hecho de que la presencia de mutaciones de E168K y G55R en un CHIKV de otro modo de tipo silvestre, resulta en atenuación intermediaria que es consistente con la presente descripción con respecto al tamaño de placa reducida o inmunogenicidad reducida *in vivo*. Sin embargo, fue inesperado que tales dos mutaciones en el antecedente del CHIKV-Δ5nsP3 atenuado podrían resultar en pérdida de inmunogenicidad en ratones como se reporta en la presente.

También se han reportado como un fenómeno común para otros alfavirus de pasaje de cultivo celular tal como el virus Sindbis (SINV; Klimstra WB, et al., Infection of neonatal mice with Sindbis virus results in a systemic inflammatory response syndrome (1999) J. Virol.; 73(12):10387-98; Klimstra WB, et al., The furin protease cleavage recognition sequence of Sindbis virus PE2 can mediate virion attachment to cell surface heparan sulfate (1999) J. Virol.; 73(8):6299-306; Byrnes and Griffin, Binding of Sindbis virus to cell surface heparan sulfate (1998) J. Virol.; 72(9):7349-56), Virus del Río Ross (RRV; Heil ML, et al., An amino acid substitution in the coding region of the E2 glycoprotein adapts Ross River virus to utilize heparan sulfate as an attachment moiety (2001) J. Virol.; 75(14):6303-9) y virus del Bosque Semliki (SFV; Smit JM, et al., Adaptation of alphaviruses to heparan sulfate: interaction of Sindbis and Semliki forest viruses with liposomes containing lipid-conjugated heparin (2002) J. Virol.; 76(20):10128-37), tales sustituciones para residuos positivamente cargados en E2 confieren la infectividad dependiente de heparan-sulfato mejorada *in vitro* y que estas mutaciones pueden ser seleccionadas dentro de pocos pasajes *in vitro* seriales. Además, se mostró que tales mutaciones conducen a atenuación de los virus *in vivo* (Byrnes AP and DE Griffin, Large-plaque mutants of Sindbis virus show reduced

binding to heparan sulfate, heightened viremia, and slower clearance from the circulation (2000) J. Virol.; 74(2):644-51; Klimstra WB, *et al.* 1999, *supra*).

Debido a las heterogeneidades de secuencia, con una
 5 caída concomitante en inmunogenicidad, fueron ya aparentes en pasajes P5 y P8 de CHIKV-Δ5nsP3, las heterogeneidades de secuencia en pasajes tempranos, así como también sus efectos en inmunogenicidad, fueron examinadas más estrechamente como se resume posteriormente.

10 **Ejemplo 3. Definición de heterogeneidades de secuencia e inmunogenicidad de CHIKV-Δ5nsP3 en el pasaje P3**

La aparición de los últimos pasajes de heterogeneidades de secuencia con efectos adversos en la inmunogenicidad de CHIKV-Δ5nsP3 como se mide por tituladores
 15 de anticuerpo neutralizante, garantizó el pasaje óptimo el cual se caracterizó por tanta alta inmunogenicidad así como también como un titulador viral suficiente para producción de una vacuna efectiva.

Para determinar la estabilidad genética del CHIKV-
 20 Δ5nsP3 durante MVSB (P1), WVSB (P2) y producción de sustancia de fármaco CHIKV-Δ5nsP3 ("VLA1553") (P3), los pasajes generados independientemente 1, 2 y 3 fueron secuenciados. Como se determina por secuenciamiento Sanger, P0 (rescate de virus), P1 (MVSB) y P2 (WVSB) no mostraron algunas
 25 heterogeneidades de secuencia obvias. La siguiente etapa fue

demostrar la reproducibilidad de estabilidad genética de sustancia de fármaco purificada derivada de P3 (DS) usando P2 (WVSB) para infección. En total, cuatro recolecciones P3 independientes, que consisten de recolecciones combinadas en el día 1 y día 2, se produjeron en dos matraces T T150 usando P2 (WVSB) para infección (MOI 0.01). Para cada réplica, las recolectas individuales en el día 1 y día 2 se combinaron (volumen total ~50 mL) y se concentraron aproximadamente 10 veces (dispositivo de ultrafiltración Amicon 100 kDa). La diafiltración se hizo contra 25 mM de Tris/150 mM de NaCl, pH 7.4, seguido por tratamiento con sulfato de protamina (concentración final 2 mg/mL) para precipitar el ADN de la célula hospedera. El sobrenadante claro entonces se purificó además por cromatografía de absorción por lotes usando resina Captocore 700 (adición de ~1 mL de 50% de suspensión en amortiguador Tris/NaCl). La resina se removió por centrifugación y se agregó sacarosa a una concentración final de 10% para permitir la congelación y descongelación de CHIKV-Δ5nsP3. La formulación final fue entonces filtrada estéril de 0.2 μ m u se congeló almacenada ($\leq -65^{\circ}\text{C}$) hasta procesamiento adicional.

En el pasaje 3 (P3), no se detectaron heterogeneidades por la llamada base automática (Eurofins - todas < 20%). Sin embargo, por inspección visual, una pequeña fracción de la población viral mostró un incremento

consistente en las heterogeneidades de secuencia de E168K y E247K en el gen para la glicoproteína E2 de CHIKV, la cual estuvo ausente en el CHIKV-Δ5nsP3 rescatado (P0) así como también las muestras MVSB y WVSB. La **Figura 7** muestra los

5 cromatogramas de secuenciamiento para las cuatro muestras DS P3 generadas independientemente (Ejemplos 1-4) comparado con el virus en los pasajes 0 (P0). Como se indica por los esquemas en recuadro, una heterogeneidad G/A en el codón para el aminoácido 168 (posición 8882 de ácido nucleico genómico)

10 fue detectable en todas las cuatro réplicas y se verificó por reacción de secuenciamiento reversa, la cual reveló la misma heterogeneidad. La misma posición en la muestra P0 mostró un pico agudo para G en la reacción de secuenciamiento delantero (y C en la reacción de secuenciamiento inversa). La

15 heterogeneidad E247K (posición 9119 de ácido nucleico genómico), por otro lado, estuvo presente pero apenas detectable en los cromatogramas de secuenciamiento.

Adicionalmente, el secuenciamiento de próxima generación de P3 se llevó a cabo y comparó con el

20 secuenciamiento del pasaje 1 (P1-MVSB) con el fin de cuantificar la cantidad de E168K y E247K dentro de la población viral. Como se puede ver en la **Figura 8**, en la etapa de P1-MVSB, solamente un nivel muy bajo de heterogeneidades de secuencia fue detectable (todo por debajo

25 del antecedente; 15% de valor de referencia indicado por la

línea punteada). Las dos muestras P3 representativas, sin embargo, mostraron un incremento total en heterogeneidades de secuencia, con dos mutaciones en el gen E2 que alcanzaron o se elevaron arriba del antecedente (E168K en 18% y 15% de la población viral - posición de ácido nucleico genómico 8882 y, en una extensión inferior, E247K - posición de ácido nucleico 9119).

En resumen, la presencia de una mutación E168K en la proteína E2 de CHIKV-Δ5nsP3 fue identificada por el secuenciamiento Sanger y NGS en ocho muestras P3 generadas independientemente, demostrando la reproducibilidad de este resultado. Ejemplos de secuenciamiento representativos se muestran en las **Figuras 7 y 8**. Estos datos demuestran que la emergencia de una mutación E168K en la proteína E2 del virus CHIKV-Δ5nsP3 fue altamente reproducible después de pasar en células Vero y que disminuye la inmunogenicidad del virus CHIKV-Δ5nsP3 atenuado como se muestra en el Ejemplo 2 donde los virus derivados de placa P5B (P5B-04 y P5B-07 en la **Figura 6**) no fueron inmunogénicos. Dos mutaciones adicionales, G55R y G82R, las cuales se observaron durante el pasaje de CHIKV-Δ5nsP3 en células Vero, como E168K, han sido reportadas por afectar la virulencia de CHIKV (Gardner CL, *et al.*, 2014, *supra*, Silva LA, *et al.*, 2014, *supra* and Gorchakov R, *et al.*, Attenuation of Chikungunya virus vaccine strain 181/clone 25 is determined by two amino acid substitutions in

the E2 envelope glycoprotein (2012) J. Virol.; 86(11):6084-96; Epub 2012/03/30), conduciendo a atenuación del virus. Puesto que estas dos mutaciones también impactaron negativamente la inmunogenicidad del CHIKV-Δ5nsP3, su
5 emergencia debe ser evitada para la producción de un candidato de vacuna CHIKV-Δ5nsP3 altamente inmunogénico.

Las ubicaciones de aminoácidos propensos a mutación dentro del dímero E1/E2 se muestran en la **Figura 9**. Los tres aminoácidos E2 G55, G82 y E168, son todos accesibles en la
10 superficie y por lo tanto, su mutación puede afectar potencialmente las interacciones del CHIKV dentro de sus receptores celulares. Por el contrario, E247[E2] está más enterrado dentro de la estructura de la proteína y de este modo no puede estar expuesto en la superficie en la misma
15 extensión. La posición de E247 puede ser una razón porqué la mutación E247K no afecta notablemente la inmunogenicidad de CHIKV-Δ5nsP3 como se muestra anteriormente.

**Ejemplo 4. Determinación del umbral de la mutación E168K para pérdida de inmunogenicidad de una población del
20 virus CHIKV-Δ5nsP3 heterogéneo**

Las observaciones anteriores indican que la mutación E168K[E2] aparece tempranamente y frecuentemente durante el pasaje de CHIKV-Δ5nsP3 en células Vero y está asociada con pérdida de inmunogenicidad. Con el fin de
25 desarrollar un proceso para la manufactura confiable de una

vacuna del virus Chikungunya atenuado vivo inmunogénico, efectivo, la tolerancia para esta mutación en una muestra de la vacuna CHIKV-Δ5nsP3 se probó preparando diferentes relaciones de la sustancia del fármaco P3 y el virus P5B-07
5 (mutante único E168K; véase **Tabla 3**).

La sustancia de fármaco del pasaje 3 (P3), el cual presenta aproximadamente 20% de heterogeneidad E168K (datos no mostrados), se mezcló con una preparación de CHIKV-Δ5nsP3 a partir del aislado P5B-07 (mutante E168K) a relaciones de
10 1:0.1, 1:1 y 1:10. Las mezclas se secuenciaron para verificar la frecuencia aproximada de la mutación E168K en cada preparación del virus. Como se muestra en la **Figura 10** (véase fila de heterogeneidad etiquetada), la cantidad relativa de nucleótido A, comparada con el nucleótido G de tipo
15 silvestre, se muestra por incrementar con niveles aumentados de aislado de P5B-07 agregado (hasta 100% A en el grupo 7 de control E168K).

Con el fin de determinar el efecto de la mutación E168K en inmunogenicidad, los ratones C57Bl/6 se inmunizaron
20 s.c. con las diferentes muestras de CHIKV-Δ5nsP3 especificadas en la **Figura 10** con una dosis propuesta de 3×10^4 TCID₅₀ (la dosis actual se muestra en la **Figura 11D**). Suero de ratones de 21 días se recolectaron y suero individual de los grupos 1:0.1, 1:1 y 1:10 se probaron y
25 compararon con suero combinado a partir de los dos grupos de

control, P3 (Grupo 6) y P5B-07 (E168K; Grupo 7) usando un ensayo de neutralización a base de partícula de replicón de virus (VRP) (**Figura 11**). Las VRPs se parecen a proteínas de envoltura y cápsido que despliega el CHIKV de tipo silvestre
5 deficiente de replicación del virus LR2006-OPY1. El método se llevó a cabo esencialmente como se describe por Gläsker S, *et al.* (Virus replicon particle based Chikungunya virus neutralization assay using Gaussia luciferase as readout (2013) *Virology*. J.; 10:235). Las VRPs se produjeron co-
10 transfectando células BHK-21 con un replicón de CHIKV que expresa luciferasa Gaussia (GLuc) y dos ARNs auxiliares que expresan la proteína cápsida CHIV de tipo silvestre y las proteínas estructurales restantes (E3, E2, 6K and E1), respectivamente. Se usaron partículas infecciosas redondas
15 únicas resultantes en el ensayo de neutralización del CHIKV usando un GLuc secretado como una lectura. Después de la neutralización de las VRPs en el ensayo de Luciferasa, una reducción de la expresión de GLuc por células BHK-21 puede ser medida. Se observó que la capacidad para provocar
20 inmunidad neutralizante cayó con cantidades superiores del mutante E168K (**Figuras 11A, B y C**, respectivamente). El número de ratones individuales que muestran ya sea respuestas inmune bajas positivas o negativas al virus Chikungunya se muestra en la **Figura 11D**.

25 Este hallazgo confirma que, como la relación del

mutante E168K a las partículas virales de tipo silvestre en una población de virus incrementa, la inmunogenicidad de CHIKV-Δ5nsP3 en ratones se disminuye. Es por lo tanto crucial monitorear estrechamente la posición E168 en E2 para asegurar la alta inmunogenicidad de la vacuna CHIKV-Δ5nsP3. Con base en varios procesos de pasaje y cuantificación de E168K dentro de la población viral en el pasaje 8, se observó que una relación de aproximadamente 70% de la mutación E168K dentro de la población CHIKV-Δ5nsP3, la inmunogenicidad se perdió cuando se analizaron combinaciones de suero de ratón en PRNT.

Ejemplo 5. Proceso corriente arriba para reducir las mutaciones de E168K en CHIKV-Δ5nsP3

El objetivo de este ejemplo fue caracterizar un proceso a base de cultivo de células Vero optimizado para la producción de CHIKV-Δ5nsP3 en botellas rodantes. Los impactos de varios parámetros de procesos corriente arriba (MOI, día de infección de células Vero después de plaqueado y temperatura de incubación) en la productividad viral y heterogeneidad de secuencia de la proteína E2 se probaron usando el Banco de Semillas del Virus de Trabajo GMP (GMP WWSB B3005044; pasaje 2, también referido en la presente como "P2 CHIKV-Δ5nsP3") y el banco de células de trabajo Vero R&D para producir sustancia de fármaco (DS; pasaje 3, es decir, también referido en la presente como "P3 CHIKV-Δ5nsP3").

Preparación de GMP WWSB B3005044

Un Banco de Semilla de Virus Pre-Principal caracterizado (PMVSB, Banco de Semilla del Virus Pre-Principal AFR886/197579 a partir del rescate del virus de células Vero) se estableció bajo las condiciones R&D y se usó

5 un Banco de Semilla del Virus Pre-Principal para generar los Bancos de Semilla Principales del CHIKV-Δ5nsP3 bajo condiciones de GMP. El Banco de Semillas del Virus de Trabajo GMP, VLA78-1553-WVSB-2016, lote B3005044 se produjo en Halix B.V. bajo el mismo método de producción y condiciones GMP

10 como se describe para el VLA78-1553-MVSB-2016, lote #B3005567. Brevemente, el Banco de Células de Trabajo VERO (designación interna: ICB 2014/002) se expandió en cuatro etapas en una serie de semillas usando matraces T75cm² (1X), después en matraces T175cm² (3X) y en la última etapa

15 botellas rodantes de 6x850cm² como se muestra en la **Fig. 12**. Cuatro de seis botellas rodantes se usaron para la producción de los bancos de semilla de CHIKV-Δ5nsP3. La cantidad total de células en las cuatro botellas rodantes se determinó. El Banco de Semillas de Virus Pre-Principal se usó para generar

20 el Banco de Semillas del Virus Principal de CHIKV-Δ5nsP3. Subsecuentemente, el Banco de Semillas del Virus Principal de CHIKV-Δ5nsP3 se usó para generar el Banco de Semillas del Virus de Trabajo de CHIKV-Δ5nsP3. La infección se hizo en todas las etapas en un MOI de 0.01. Después de 24 horas de

25 infección (35°C; 5% de CO₂; 0.5 de RPM) se recolectó el

CHIKV-Δ5nsP3. Solución base de sacarosa y Tris se agregaron a una concentración final de 5% de Sacarosa y 25 mM en la combinación de recolección. Después de la formulación, la combinación se filtró a través de un filtro de 0.22 µm
5 esterilizado por vapor en un contenedor de proceso bio de 50 mL estéril usando una bomba peristáltica. El llenado de viales se hizo uno por uno con 0.7 mL de recolección filtrada y formulada usando una bomba de llenado peristáltica. Se usó un dispositivo tapador/destapador ThermoFisher para abrir y
10 cerrar los Cryo viales 2D Matrix. Los viales llenos de los bancos de semilla GMP se almacenaron a <-65°C.

Cultivo de Células Vero

El cultivo de células Vero se realizó a 35°C y 5% de CO₂ en matraces T de T75 cm² (T75), T175 cm² (T175) y
15 botellas rodantes de 850cm² (850RB). Las células Vero usadas en los diferentes experimentos se derivaron a partir del banco de células principales GMP MCB ICB/2014/001. La designación interna de este banco de células de trabajo de investigación fue Bk5685. El banco de células principales GMP
20 se derivó a partir del banco de células Vero 10-87 P134 el cual se originó a partir del banco P129 del Institut Merieux (Aventis Pasteur) y finalmente a partir del banco original de la ATCC CCL 81 P113. Más detalles con respecto a la serie de cultivo celular se muestran en la **Figura 12**. Las células se
25 mantuvieron en medio MEM suplementado con 10% de FBS y 2 mM

de L-glutamina.

Producción del Virus en Botellas rodantes de 850cm²

Después de dos, cuatro o cinco días de expansión
5 celular a 35°C en 850RB, las células se lavaron con PBS e infectaron con el CHIKV-Δ5nsP3 (WVSB B3005044) a MOIs de 0.1, 0.01 or 0.001 TCID₅₀/célula. Para producción del virus, las células infectadas se incubaron a 37°C, 35°C o 28°C en 100 mL de medio MEM suplementado con 2 mM de glutamina.

10 *Titulación del Virus*

Los tituladores del virus se determinaron en células Vero usando el ensayo TCID₅₀. Las células se sembraron en microplacas e infectaron con muestras del virus diluidas serialmente 10 veces en EMEM suplementado con 0.5% de FBS y 2
15 mM de glutamina. Después de una incubación de una semana a 35°C/5% de CO₂, los efectos citopáticos inducidos por virus se monitorearon y los tituladores virales se calcularon de conformidad con el método Reed y Muench (Reed, L.J.; Muench, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints
20 (1938) The American Journal of Hygiene 27:493-497).

Extracción y secuenciamiento de genoma del virus

El ácido nucleico viral se extrajo y purificó a partir de sobrenadante de cultivo de células Vero en los puntos de tiempo indicados usando el Kit de Centrifugación de
25 Virus QIAamp MinElute (Qiagen) y la síntesis de ADNc se

realizó usando Sistema de Síntesis de Primera Hebra SuperScript III (ThermoFischer) usando hexámeros aleatorios. Para secuenciamiento de la región del gen E2, primero, las PCRs con Polimerasa de Alta Fidelidad Phusion (ThermoFischer) se hicieron usando cebadores 16F, 16R, 17F, 17R, 18F y 18R (para secuencias cebadoras, véase Tabla 1) para amplificar regiones traslapantes del gen CHIKV E2. Después de la purificación de amplicones de PCR, el secuenciamiento Sanger se realizó en MWG Eurofins, Germany. En adición a los análisis de heterogeneidades de secuencia que se detectaron por la llamada bases automáticas (>20%), todos los cromatogramas de secuenciamiento fueron leídos manualmente para detectar también heterogeneidades por debajo del límite de detección (< 20%).

Optimización de un proceso para producir una sustancia de fármaco P3 CHIKV- Δ 5nsP3 inmunogénico

Para optimizar el proceso para producir el pasaje 3 de CHIKV- Δ 5nsP3 en células Vero, diferentes MOIs, tiempos de infección de células Vero post-sembrado y temperaturas de incubación se probaron en todas las combinaciones como se muestra en la **Tabla 5**. Adicionalmente, los rendimientos se analizaron en diferentes días después de la infección. Se monitorearon tres aspectos de los virus recolectados: productividad viral, estabilidad del titulador así como también el nivel de heterogeneidad de secuencia de la

proteína estructural E2.

Tabla 5. Parámetros probados para la producción de CHIKV-Δ5nsP3 en células Vero en botellas rodantes de 850 cm² y los parámetros del proceso optimizado identificados.

	Probado*	Proceso optimizado
MOI (TCID ₅₀ /célula)	0.1, 0.01, 0.001	0.01
Tiempo de infección celular (sembrado celular posterior)	D2, D4, D5	D4
Temperatura (°C)	37, 35, 28	35

*se realizaron todas las combinaciones.

Producción del virus

Las cinéticas de producción de CHIKV-Δ5nsP3 logradas para todas las condiciones probadas se muestran en la **Figura 13**. El proceso óptimo actualmente usado para producir CHIKV-Δ5nsP3 (35°C, MOI 0.01, la infección en el día 4 después del sembrado de las células Vero) también se incluyó en el experimento, mostrando la productividad del virus al nivel esperado de 10^{8.0-8.5}/mL 24h después de la infección (**Fig. 13B**).

Comparado con MOI y el tiempo de infección, la temperatura tiene el mayor impacto en las cinéticas de la producción viral. A 37°C y 35°C (**Fig. 13A y 13B**, respectivamente), se logró la productividad máxima en el día uno post-infección. La infectividad de CHIKV-Δ5nsP3 cayó sustancialmente durante las subsecuentes 24 horas, con un titulador viral ligeramente menos pronunciado perdido a 35°C.

La reducción de la temperatura a 28°C resultó en un cambio marcado de las cinéticas virales. La productividad viral máxima se retardó uno a cuatro días dependiendo del MOI usado; y se observó la estabilidad del titulador del virus significativamente mejorada (**Fig. 13C**). El rendimiento del virus total producido a partir de todas las recolecciones se muestra en la **Fig. 14**. Para la condición a 28°C como se muestra en la **Fig. 13A**, los rendimientos de las dos recolecciones se combinaron (día 1 y día 2 post-infección); para la condición a 35°C (**Fig. 13B**), los rendimientos de todas las tres recolecciones se combinaron (días 1-3) y para la condición a 37°C (**Fig. 13C**), se combinaron los rendimientos de cinco recolecciones (días 1-5).

Para completar las observaciones iniciales, los datos de estabilidad del titulador y productividad viral se analizaron usando un modelo cuadrático de superficie de respuesta (**Figs. 15 y 16**). Para productividad viral, se usaron los valores tituladores del virus máximo. Para estabilidad del titulador del virus, el valor delta que resulta de la sustracción del titulador máximo a partir del titulador medido en el día después en el proceso de producción se calculó y usó. Para la productividad del virus total, los tituladores individuales en cada punto de tiempo se agregaron.

Con análisis ANOVA de ambos modelos, fue posible

indicar los factores que tienen influencias estadísticamente significantes (**Figs. 15A y 16A**). Confirmando las observaciones previas, la temperatura fue el factor más fuerte que afecta la reproductividad viral y estabilidad. En particular, bajas temperaturas (28°C) permiten tituladores virales superiores mientras mantienen el titulador de virus razonablemente estable con el tiempo. Sin embargo, no hubo una reproductividad de virus total general significativamente superior en esta temperatura comparada con 35°C (véase esp. **Fig. 14**).

El tiempo de infección después de sembrar células Vero también tiene influencia en la respuesta, pero en una extensión menor. El MOI no tiene un impacto significativo. Para ambos modelos, la infección a 72h post-sembrado celular fue un tiempo adecuado para la infección de células. Contrariamente, una temperatura única no permite combinar producción del virus óptima y estabilidad del titulador puesto que los rendimientos virales más altos se encontraron a 35°C y los tituladores más estabilizados se observaron a 28°C (**Figs. 15B y 16B**). La productividad del virus total máxima dentro del tiempo post-infección más corto se logró a 35°C (véase **Fig. 14**).

Análisis de secuencia de gen de proteína E2

Las muestras de virus recolectadas en ya sea el día 2 o día 5 después de la infección de células Vero (infectadas

en el día 4 post-sembrado) se seleccionaron para conducir un análisis de la secuencia de ARN genómico de la proteína estructura E2 viral. Estas muestras son más representativas para la confluencia de células Vero o botellas rodantes. Las

5 **Tablas 6 y 7** abajo resumen el porcentaje de heterogeneidades estimadas para cuatro posiciones de aminoácido (AA) con base en la secuencia de ácido nucleico determinada por secuenciamiento Sanger. La **Tabla 6** muestra datos para el crecimiento de CHIKV-Δ5nsP3 en tres diferentes temperaturas y

10 recolectados dos días post-infección y la **Tabla 7** muestra datos para CHIKV-Δ5nsP3 que crece a 28°C y recolectados 5 días post-infección.

Tabla 6. Análisis de secuencia de genoma de ARN para proteína viral E2 a partir de 2 recolecciones de muestra

15 **post-infección.** Se muestran los porcentajes estimados de heterogeneidades de ácido nucleico que corresponden a cuatro posiciones AA (indicadas en paréntesis), como se determina pos secuenciamiento Sanger. La heterogeneidad en la posición de ácido nucleico 9649 es una mutación silente.

20

Tiempo post-sembrado en botellas rodantes	D4								
Temperatura	28°C			35°C			37°C		
MOI	0.1	0.01	0.001	0.1	0.01	0.001	0.1	0.01	0.001

25

(TCID ₅₀ /célula)									
<i>Pos. 8543 (G55R)</i>	0	0	0	0-5	0-5	0-5	0	0	0
<i>Pos. 8882 (E168K)</i>	30	30	40-50	25	25	30-50	25	25	30-50
<i>Pos. 9119 (E247K)</i>	0-5	0-5	0-5	5-10	10	10-20	10-20	10-20	10-20
<i>Pos. 9649 (A423, Silente)</i>	0-5	5-10	10-20	5	5	5-10	0-5	0-5	5-10

10 **Tabla 7. Análisis de la secuencia del genoma de ARN**
 para la proteína viral E2 a partir de recolecciones de
 muestra post-infección D5. Se muestran los porcentajes
 estimados de heterogeneidades de ácido nucleico que
 corresponden a cuatro posiciones AA (indicadas en
 15 paréntesis), como se determina por el secuenciamiento Sanger.
 La heterogeneidad en la posición del ácido nucleico 9649 es
 una mutación silente.

Tiempo post-sembrado en botellas rodantes	D4		
Temperatura	28 °C		
MOI (TCID₅₀/célula)	0.1	0.01	0.001
<i>Pos. 8543 (G55R)</i>	0	0	0
<i>Pos. 8882 (E168K)</i>	30-40	40-50	50
<i>Pos. 9119 (E247K)</i>	0-5	0-10	10

Pos. 9649 (A423, Silente)	0-5	0-5	10-20
----------------------------------	-----	-----	-------

MOI, temperatura, día de infección post-sembrado de células Vero y día de recolección de muestra, todos tienen
5 influencia en la productividad y la calidad de CHIKV-Δ5nsP3 cuando se producen en células Vero. La intensidad de cada parámetro, sin embargo, fue de diferente importancia. Por ejemplo, los resultados sugieren una correlación entre MOI y niveles de heterogeneidad, es decir, a inferior la entrada
10 viral en la infección, superior el nivel observado de heterogeneidad en la recolección. La temperatura de incubación no parece impactar la estabilidad de la secuencia de nucleótido, con la excepción de Pos. 9119 (E247K) donde se observó un nivel superior de heterogeneidad a 37°C (**Tabla 6**).
15 También, la recolección de muestra tomada después en la cinética viral activó un nivel ligeramente superior de heterogeneidad para la misma posición AA.

Para completar este primer análisis, también se realizó la modelación matemática de los datos sin procesar
20 (**Figs. 17 y 18**). Solamente tres posiciones de ácido nucleico (Pos. 8882, 9119, 9649) podrían ser analizadas ya que ningún modelo significativo se calculó para la posición 8543. Como se indica en la **Figura 17**, la temperatura y MOI tienen diferentes impactos dependiendo de la posición de ácido
25 nucleico considerado. El MOI significativamente ha

influenciado las heterogeneidades observadas para las posiciones de ácido nucleico 8882 y 9649, pero no para 9112. La temperatura afecta las posiciones 9112 y 9649, pero no a 8882 (**Fig. 17**). Se mostró el MOI por influenciar

5 consistentemente el nivel de heterogeneidad cuando muestras de recolección post-infección D2 y D5 a partir del virus producido a 28°C fueron de niveles minimizados comparados de heterogeneidad AA, que se observaron cuando células fueron inoculadas con una alta cantidad de virus (MOI 0.1

10 TCID₅₀/célula). Esta observación podría promover el establecimiento de nuevos ajustes de parámetro de proceso con un MOI superior como un medio para lograr la estabilidad de titulador/producción de virus máxima mientras se asegura un bajo nivel de heterogeneidad dentro de la proteína E2. Sin

15 embargo, un MOI de 0.1 resulta en consumo significativamente superior del banco de semillas del virus de trabajo GMP, de este modo limitando su aplicabilidad industrial práctica.

El día de recolección después de la post-infección impactó solamente la variación de la posición de ácido

20 nucleico 9119 (**Fig. 18**).