

REIVINDICACIONES

Habiéndose descrito la invención como antecede, se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes reivindicaciones:

1. Una composición farmacéutica caracterizada porque comprende

(i) partículas de Chikunguya inmunogénico CHIKV-Δ5nsP3, que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1, que expresan una proteína estructural E2 ~~como se define porque comprende~~ la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; y

(ii) partículas de CHIKV-Δ5nsP3 que expresan una proteína estructural E2 que comprenden una mutación reductora de la inmunogenicidad comparada con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, en donde dicha mutación cubre las regiones genómicas que codifican los aminoácidos 55 o 168.

2. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 1, que comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable.

3. Una composición farmacéutica, caracterizada porque

comprende

- (i) partículas de CHIKV-Δ5nsP3; y
- (ii) un excipiente farmacéuticamente aceptable; en donde
30% a ~~100~~99% de las partículas de CHIKV-Δ5nsP3
presentes en la composición expresan una proteína
estructural E2 ~~como se define porque comprende~~ la
secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

4. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3~~la reivindicación 1 o 2~~, caracterizada porque 50% a ~~100~~99%, ~~75% a 100% o 90% a 100%~~ de las partículas de CHIKV-Δ5nsP3 presentes en la composición expresan una proteína estructural E2 ~~como se define porque comprende~~ la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

5. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque 75% a 99% de las partículas de CHIKV-Δ5nsP3 presentes en la composición expresan una proteína estructural E2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

6. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque 90% a 99% de las partículas de CHIKV-Δ5nsP3 presentes en la

composición expresan una proteína estructural E2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

7. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 63, caracterizada porque ~~un máximo del 1% a 50%, un máximo del 1% a 25% o un máximo del 1% a 10%~~ de las partículas de CHIKV-Δ5nsP3 presentes en la composición expresan una proteína estructural E2 que tiene una mutación reductora de la inmunogenicidad con respecto a la secuencia de aminoácidoss de la SEQ ID NO: 2.

8. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizada porque 1% a 25% de las partículas de CHIKV-Δ5nsP3 presentes en la composición expresan una proteína estructural E2 que tiene una mutación reductora de la inmunogenicidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

5-9. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizada porque 1% a 10% de las partículas de CHIKV-Δ5nsP3 presentes en la composición expresan una proteína estructural E2 que tiene una mutación reductora de la inmunogenicidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

10. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 49, caracterizada porque un ~~máximo de 1% a~~ 50%, ~~un máximo de 25% o un máximo de 10%~~ de las partículas de CHIKV-Δ5nsP3 presentes en la composición expresan una proteína estructural E2 que tiene la mutación E168K en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

11. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizada porque un 1% a 25% de las partículas de CHIKV-Δ5nsP3 presentes en la composición expresan una proteína estructural E2 que tiene la mutación E168K en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

12. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizada porque un 1% a 10% de las partículas de CHIKV-Δ5nsP3 presentes en la composición expresan una proteína estructural E2 que tiene la mutación E168K en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

~~6.~~

13. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a ~~6~~12, caracterizada porque 1%

~~a-50%, 5-30% o 10-20%~~ de las partículas de CHIKV-Δ5nsP3 presentes en la composición expresan una proteína estructural E2 que tiene una mutación reductora de la inmunogenicidad, preferiblemente la mutación E168K, en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

14. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizada porque 5% a 30% de las partículas de CHIKV-Δ5nsP3 presentes en la composición expresan una proteína estructural E2 que tiene una mutación reductora de la inmunogenicidad, preferiblemente la mutación E168K, en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

~~7-15.~~ La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizada porque 10% a 20% de las partículas de CHIKV-Δ5nsP3 presentes en la composición expresan una proteína estructural E2 que tiene una mutación reductora de la inmunogenicidad, preferiblemente la mutación E168K, en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

~~8-16.~~ La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a ~~715~~, caracterizada porque se obtiene o es obtenible por producción de

partículas de CHIKV-Δ5nsP3 en células Vero.

17. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 ~~8~~, caracterizada porque tal composición induce anticuerpos neutralizantes contra CHIKV-Δ5nsP3 en un ratón inmunizado con tal composición farmacéutica que resulta en un suero que comprende tales anticuerpos neutralizantes y en donde tal suero neutraliza la infección de CHIKV de células, por ejemplo, células Vero, en un ensayo de neutralización *in vitro*, 50% a 100%, ~~preferiblemente 60% a 100%, preferiblemente 70% a 100%, más preferiblemente 80% a 100%, aún más preferiblemente 90% a 100%, muy preferiblemente 95% a 100%~~ a una dilución de suero 1:80.

18. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, caracterizada porque tal composición induce anticuerpos neutralizantes contra CHIKV-Δ5nsP3 en un ratón inmunizado con tal composición farmacéutica que resulta en un suero que comprende tales anticuerpos neutralizantes y en donde tal suero neutraliza la infección de CHIKV de células, por ejemplo, células Vero, en un ensayo de neutralización *in vitro*, 60% a 100%, a una dilución de suero 1:80.

19. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, caracterizada porque tal composición induce anticuerpos neutralizantes contra CHIKV-Δ5nsP3 en un ratón inmunizado con tal composición farmacéutica que resulta en un suero que comprende tales anticuerpos neutralizantes y en donde tal suero neutraliza la infección de CHIKV de células, por ejemplo, células Vero, en un ensayo de neutralización *in vitro*, 70% a 100%, a una dilución de suero 1:80.

20. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, caracterizada porque tal composición induce anticuerpos neutralizantes contra CHIKV-Δ5nsP3 en un ratón inmunizado con tal composición farmacéutica que resulta en un suero que comprende tales anticuerpos neutralizantes y en donde tal suero neutraliza la infección de CHIKV de células, por ejemplo, células Vero, en un ensayo de neutralización *in vitro*, 80% a 100% a una dilución de suero 1:80.

21. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, caracterizada porque tal composición induce anticuerpos neutralizantes contra CHIKV-Δ5nsP3 en un ratón inmunizado con tal composición farmacéutica que resulta en un suero que comprende tales

anticuerpos neutralizantes y en donde tal suero neutraliza la infección de CHIKV de células, por ejemplo, células Vero, en un ensayo de neutralización *in vitro*, 90% a 100%, a una dilución de suero 1:80

22. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, caracterizada porque tal composición induce anticuerpos neutralizantes contra CHIKV-Δ5nsP3 en un ratón inmunizado con tal composición farmacéutica que resulta en un suero que comprende tales anticuerpos neutralizantes y en donde tal suero neutraliza la infección de CHIKV de células, por ejemplo, células Vero, en un ensayo de neutralización *in vitro*, 95% a 100% a una dilución de suero 1:80

9.

10.23. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 228, caracterizada porque tal CHIKV-Δ5nsP3 en (i) ~~se define por~~comprende la secuencia de ~~poli~~nucleótidos de la SEQ ID NO: 1.

11.24. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a ~~1023~~23, caracterizada porque una mutación reductora de la inmunogenicidad de

tal en la proteína estructural E2 se selecciona a partir de E168K y G55R.

~~12-25.~~ La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a ~~2411~~, caracterizada porque una mutación reductora de la inmunogenicidad de tal en la proteína estructural E2 es E168K.

~~13-26.~~ La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a ~~2512~~; caracterizada porque tal composición farmacéutica comprende una cantidad efectiva de partículas de CHIKV-Δ5nsP3 las cuales expresan una proteína estructural E2 ~~como se define porque comprende~~ la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, en donde tal cantidad efectiva se define como mínimo 10^2 , mínimo 10^3 , mínimo 10^4 , mínimo 10^5 , mínimo 10^6 , preferiblemente mínimo 10^3 partículas de CHIKV-Δ5nsP3 las cuales expresan una proteína estructural E2 ~~como se define porque comprende~~ la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

~~14.~~ La composición farmacéutica inmunogénica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizada porque tal composición farmacéutica comprende una cantidad efectiva de partículas de CHIKV-

~~Δ5nsP3 las cuales expresan una proteína estructural E2 como se define por la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 2, en donde tal cantidad efectiva se define como una cantidad suficiente para prevenir la viremia del virus de Chikungunya en un sujeto vacunado.~~

15.27. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 1426, caracterizada porque tal composición farmacéutica es ~~una composición farmacéutica~~ de una sola dosis.

16.28. Un proceso para producir una composición farmacéutica que comprende partículas de CHIKV-Δ5nsP3 las cuales expresan una proteína estructural E2 ~~como se define porque comprende~~ la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, ~~en donde las partículas de CHIKV-Δ5nsP3 se hacen crecer en células hospederas de tal forma que se minimiza la presencia de mutaciones que reducen la inmunogenicidad del virus,~~ caracterizado porque comprende las etapas de:

- i) hacer crecer en una línea celular partículas de virus CHIKV-Δ5nsP3 con una secuencia de nucleótidos que comprende la SEQ ID NO: 1; y
- ii) realizar pasajes de dichas CHIKV-Δ5nsP3 un máximo de 5 veces después del rescate viral.

~~— hacer crecer CHIKV-Δ5nsP3 en células hospederas en tal~~

~~forma para minimizar la presencia de mutaciones que reducen la inmunogenicidad del virus.~~

17-29. El proceso de conformidad con la reivindicación 1628, caracterizado porque se usa un pasaje 2 (P2) del virus CHIKV-Δ5nsP3.

~~18. Un proceso para producir una composición farmacéutica, caracterizado porque comprende partículas de CHIKV-Δ5nsP3, que comprende la etapa de pasar CHIKV-Δ5nsP3 con una secuencia de polinucleótidos como se define por la SEQ ID NO: 1 en células hospederas en cultivo menos de 5 veces después del rescate viral.~~

19-30. El proceso de conformidad con la reivindicación 2815, caracterizado porque se usa ~~Un proceso para producir un~~ pasaje 3 (P3) de partículas . ~~de CHIKV-Δ5nsP3 que comprenden partículas de CHIKV-Δ5nsP3 las cuales expresan una proteína estructural E2 como se define por la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 2, caracterizado porque comprende la etapa de:~~

~~-hacer crecer CHIKV-Δ5nsP3 en células hospederas en tal forma para minimizar la presencia de mutaciones que reducen la inmunogenicidad del virus.~~

~~20.~~31. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones ~~16~~28, ~~29~~17 o ~~30~~19, caracterizado porque la frecuencia de tales mutaciones que reducen la inmunogenicidad en una proteína estructural E2 de CHIKV- Δ 5nsP3 que ~~tiene~~comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 se reduce comparada con la frecuencia de mutaciones que reducen la inmunogenicidad en una proteína estructural E2 de CHIKV- Δ 5nsP3 obtenida pasando CHIKV- Δ 5nsP3 con una secuencia de ~~poli~~nucleótidos ~~como se define~~ porque comprende la SEQ ID NO: 1 en células hospederas en cultivo cinco o más veces.

~~21.~~32. El proceso de conformidad con la reivindicación ~~20~~31, caracterizado porque la frecuencia de tales mutaciones que reducen la inmunogenicidad se reduce por 10% a 100%, 20% a 100%, 30% a 100% o 50% a 100% comparado con el pasaje de cinco o más veces.

~~22.~~ El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones ~~16~~, ~~17~~ o ~~19~~ a ~~21~~, caracterizado porque tales mutaciones que reducen la inmunogenicidad están localizadas en la proteína estructural E2 como se define por la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 2.

~~23.~~33. El proceso de conformidad con la reivindicación ~~21~~32,

caracterizado porque tales mutaciones ~~que~~
~~reducen~~reductoras de la inmunogenicidad localizadas en la
 proteína estructural E2, se seleccionan a partir de G55R
 y E168K.

~~24.~~34. El proceso de conformidad con cualquiera de las
 reivindicaciones ~~16~~28, ~~17-29~~ o ~~19~~30 a ~~23~~33, caracterizado
 porque tales mutación(es) ~~que~~~~reducen~~reductora de la
 inmunogenicidad localizadas en la proteína estructural E2
~~son~~es E168K.

35. El proceso de conformidad con la reivindicación~~24~~34,
 caracterizado porque la frecuencia de tal mutación E168K
 de la proteína estructural E2 es de 0 a 90%, de 0 a 80%,
 de 0 a 70%, de 0 a 60%, de 0 a 50%, de 0 a 40%, de 0 a
 30%, de 0 a 20%, 0 de 10%, ~~preferiblemente de 0 a 50%~~ en
 la combinación total de CHIKV-Δ5nsP3 recolectado.

~~25.~~36. El proceso de conformidad con la reivindicación~~34~~,
caracterizado porque la frecuencia de tal mutación E168K
de la proteína estructural E2 es de 0 a 50%, en la
combinación total de CHIKV-Δ5nsP3 recolectado.

~~26.~~37. El proceso de conformidad con cualquiera de las
 reivindicaciones ~~16-28~~ a ~~25~~36, caracterizado porque el

CHIKV- Δ 5nsP3 con una secuencia de ~~poli~~nucleótidos ~~como se define porque comprende~~ la SEQ ID NO: 1 se pasa en las células hospederas en cultivo un máximo de cinco veces, ~~preferiblemente un máximo de cuatro veces, preferiblemente un máximo de tres veces, preferiblemente un máximo de dos veces, más preferiblemente solamente una vez, muy preferiblemente un máximo de tres veces.~~

38. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 28 a 36, caracterizado porque el CHIKV- Δ 5nsP3 con una secuencia de nucleótidos que comprende la SEQ ID NO: 1 se pasa en las células hospederas en cultivo un máximo de cuatro veces.

39. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 28 a 36, caracterizado porque el CHIKV- Δ 5nsP3 con una secuencia de nucleótidos que comprende la SEQ ID NO: 1 se pasa en las células hospederas en cultivo un máximo de tres veces.

40. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 28 a 36, caracterizado porque el CHIKV- Δ 5nsP3 con una secuencia de nucleótidos que comprende la SEQ ID NO: 1 se pasa en las células hospederas en cultivo un máximo de dos veces.

41. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 28 a 36, caracterizado porque el CHIKV-Δ5nsP3 con una secuencia de nucleótidos que comprende la SEQ ID NO: 1 se pasa en las células hospederas en cultivo un máximo de una vez.

~~27.~~42. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones ~~16-28~~ a ~~26~~41, caracterizado porque las células hospederas se hacen crecer a una temperatura de 28°C a 37°C, ~~preferiblemente 35°C.~~

43. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 28 a 41, caracterizado porque las células hospederas se hacen crecer a una temperatura de 35°C.

~~28.~~44. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones ~~16-28~~ a ~~27~~43, caracterizado porque las células hospederas son infectadas entre el día 2 y el día 5 después del sembrado, ~~preferiblemente al día 4 después del sembrado.~~

45. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 28 a 43, caracterizado porque las células hospederas son infectadas al día 4 después del sembrado.

29-46. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 2816 a 4528, caracterizado porque las células hospederas son células Vero.

30-47. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 16-28 a 2946, caracterizado porque las partículas de CHIKV-Δ5nsP3 son recolectadas en el día uno y/o día dos después de la infección celular.

31-48. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 16-28 a 3047, caracterizado porque la multiplicidad de infección (MOI) usada para producir tales partículas de CHIKV-Δ5nsP3 ~~o tal composición farmacéutica que comprende partículas de CHIKV-Δ5nsP3~~ es máximo 0.1, ~~preferiblemente entre 0.1 y 0.001, más preferiblemente entre 0.09 y 0.0011, aún más preferiblemente entre 0.05 and 0.005, muy preferiblemente 0.01.~~

49. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 28 a 47, caracterizado porque la multiplicidad de infección (MOI) usada para producir tales partículas de CHIKV-Δ5nsP3 es de entre 0.1 y 0.001.

50. El proceso de conformidad con cualquiera de las

reivindicaciones 28 a 47, caracterizado porque la multiplicidad de infección (MOI) usada para producir tales partículas de CHIKV-Δ5nsP3 es de entre 0.09 y 0.0011.

51. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 28 a 47, caracterizado porque la multiplicidad de infección (MOI) usada para producir tales partículas de CHIKV-Δ5nsP3 es de entre 0.05 y 0.005.

52. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 28 a 47, caracterizado porque la multiplicidad de infección (MOI) usada para producir tales partículas de CHIKV-Δ5nsP3 es de 0.01.

32-53. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15-27 o 31-47 a 52, caracterizada porque tal composición farmacéutica es una vacuna.

33-54. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 32-53, caracterizada porque tal composición farmacéutica se proporciona en una forma liofilizada.