

REIVINDICACIONES

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

1. Una composición farmacéutica que comprende:

Una cantidad efectiva de partículas CHIKV-Δ5nsP3, ~~que comprenden la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1, y~~ donde al menos el 30% de las partículas CHIKV-Δ5nsP3 en la composición expresan una proteína estructural E2 ~~que comprende~~ definida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; y en donde:

1 - 50% de las partículas CHIKV-Δ5nsP3 de la composición expresan una proteína estructural E2 que tiene la mutación E168K y/o G55R que reduce la inmunogenicidad en comparación con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, donde dicha cantidad efectiva se define como una cantidad suficiente para prevenir la viremia del virus Chikungunya en un sujeto vacunado.

2. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 1, que comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable.
3. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 1 o 2, en la cual 50% a 99% de las partículas CHIKV-Δ5nsP3 presentes en la composición expresan una proteína estructural E2 que 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, caracterizada porque 1% a 25% de las partículas CHIKV- Δ 5nsP3 presentes en la composición expresan una proteína estructural E2 que tiene una mutación E168K y/o G55R que reduce la inmunogenicidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.
5. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde un 1% a 50% de las partículas CHIKV- Δ 5nsP3 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. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, la cual se obtiene o es obtenible por producción de partículas CHIKV- Δ 5nsP3 en células Vero.
7. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde tal composición induce anticuerpos neutralizantes contra CHIKV- Δ 5nsP3 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, células Vero, en un ensayo de neutralización *in vitro*, 50% a 100%, a una dilución de suero 1:80.

8. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde 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, células Vero, en un ensayo de neutralización *in vitro*, 60% a 100%, a una dilución de suero 1:80.
9. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde 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, células Vero, en un ensayo de neutralización *in vitro*, 70% a 100%, a una dilución de suero 1:80.
10. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde 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, células Vero, en un ensayo de neutralización *in vitro*, 80% a 100% a una dilución de suero 1:80.
11. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera

de las reivindicaciones 1 a 7, en donde 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, células Vero, en un ensayo de neutralización *in vitro*, 90% a 100%, a una dilución de suero 1:80

- 12.** La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde 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, células Vero, en un ensayo de neutralización *in vitro*, 95% a 100% a una dilución de suero 1:80

~~**13.** La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde tal CHIKV-Δ5nsP3 en (i) comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1.~~

- 14.13.** La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a ~~12~~²³, en donde dicha mutación reductora de la inmunogenicidad en la proteína estructural E2 es E168K.

- 15.14.** La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a ~~13~~³⁴; ~~caracterizada~~

~~porque tal composición farmacéutica comprende una cantidad efectiva de partículas de CHIKV-Δ5nsP3 las cuales expresan una proteína estructural E2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2,~~ en donde dicha cantidad efectiva se define entre 10^3 a 10^5 en total de partículas de CHIKV-Δ5nsP3 las cuales expresan una proteína estructural E2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

16.15. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 145, en donde tal composición farmacéutica es de una sola dosis.

17.16. Un proceso para producir una composición farmacéutica ~~que comprendedonde al menos el 30% de las~~ partículas CHIKV-Δ5nsP3 en la composición las cuales expresan una proteína estructural E2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y en el que entre el 1 y el 50% de las partículas CHIKV-Δ5nsP3 de la composición expresan una proteína estructural E2 que tiene una mutación E168K y/o G55R que reduce la inmunogenicidad en comparación con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, que comprende las etapas de:

- i)** hacer crecer ~~en~~ células Vero infectadas con 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 tres~~4~~ veces después del rescate viral,,-
en donde las células Vero se hacen crecer a una temperatura de 28°C a 37°C

~~18-17.~~ El proceso de conformidad con la reivindicación ~~167~~, en donde la frecuencia de tales mutaciones que reducen la inmunogenicidad en una proteína estructural E2 de CHIKV-Δ5nsP3 que 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-Δ5nsP3 obtenida pasando CHIKV-Δ5nsP3 con una secuencia de nucleótidos que comprende la SEQ ID NO: 1 en células Vero en cultivo cinco o más veces.

~~19-18.~~ El proceso de conformidad con la reivindicación ~~178~~, en donde 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.

~~20-19.~~ El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones ~~167~~ a ~~189~~, en donde tal mutación reductora de la inmunogenicidad localizada en la proteína estructural E2 es E168K.

~~21-20.~~ El proceso de conformidad con la reivindicación ~~1920~~, en donde 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%, en la combinación total de CHIKV-Δ5nsP3 recolectado.

~~22-21.~~ El proceso de conformidad con la reivindicación ~~1920~~, en donde la frecuencia de tal mutación E168K de la proteína estructural E2 es de 0 a 50%, en la combinación

total de CHIKV-Δ5nsP3 recolectado.

~~23. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 22, en donde el CHIKV-Δ5nsP3 con una secuencia de nucleótidos que comprende la SEQ ID NO: 1 se pasa en las células Vero en cultivo un máximo de tres veces.~~

24.22. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1617 a 212, en donde el CHIKV-Δ5nsP3 con una secuencia de nucleótidos que comprende la SEQ ID NO: 1 se pasa en las células Vero en cultivo ~~un máximo de dos~~ veces.

25.23. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 167 a 212, en donde el CHIKV-Δ5nsP3 con una secuencia de nucleótidos que comprende la SEQ ID NO: 1 se pasa en las células Vero en cultivo ~~un máximo de una~~ vez.

~~26. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 25, en donde las células Vero se hacen crecer a una temperatura de 28°C a 37°C.~~

27.24. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 167 a 235, en donde las células Vero se hacen crecer a una temperatura de 35°C.

28.25. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 167 a 247, en donde las células Vero son infectadas entre el día 2 y el día 5 después del sembrado.

29-26. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 167 a 247, en donde las células Vero son infectadas al día 4 después del sembrado.

30-27. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 167 a 269, en donde las partículas CHIKV- Δ 5nsP3 son recolectadas en el día uno y/o día dos después de la infección de células Vero.

31-28. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 167 a 2730, en donde la multiplicidad de infección (MOI) usada para producir tales partículas CHIKV- Δ 5nsP3 es máximo 0.1.

32-29. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 167 a 2730, en donde la multiplicidad de infección (MOI) usada para producir tales partículas CHIKV- Δ 5nsP3 es de entre 0.1 y 0.001.

33-30. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 167 a 2730, en donde la multiplicidad de infección (MOI) usada para producir tales partículas CHIKV- Δ 5nsP3 es de entre 0.09 y 0.0011.

34-31. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 167 a 2730, en donde la multiplicidad de infección (MOI) usada para producir tales partículas CHIKV- Δ 5nsP3 es de entre 0.05 y 0.005.

35-32. El proceso de conformidad con cualquiera de las

reivindicaciones 1~~67~~ a ~~2730~~, en donde la multiplicidad de infección (MOI) usada para producir tales partículas CHIKV-Δ5nsP3 es de 0.01.

~~36.~~33. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 1~~56~~, en donde tal composición farmacéutica es una vacuna.

~~37.~~34. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 1~~56~~, en donde tal composición farmacéutica se proporciona en una forma liofilizada.