

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 867 954**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/12** (2006.01)

**C07K 14/005** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.12.2016 PCT/EP2016/082659**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.06.2017 WO17109222**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2016 E 16826738 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.03.2021 EP 3393505**

54 Título: **Vacunas recombinantes contra el Zika**

30 Prioridad:

**23.12.2015 EP 15202480**

**29.03.2016 EP 16162688**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**21.10.2021**

73 Titular/es:

**THEMIS BIOSCIENCE GMBH (100.0%)**

**Muthgasse 11/2**

**1190 Vienna, AT**

72 Inventor/es:

**TAUBER, ERICH;  
SCHRAUF, SABRINA;  
MÜLLNER, MATTHIAS;  
RAMSAUER, KATRIN;  
IRMLER, ANGELIKA y  
CSAR, PATRICK**

74 Agente/Representante:

**CURELL SUÑOL, S.L.P.**

ES 2 867 954 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Vacunas recombinantes contra el Zika

### 5 Campo técnico

La presente invención se refiere al suministro de composiciones inmunógenas o de vacuna que comprenden por lo menos un antígeno recombinante del virus del Zika, en el que el por lo menos un antígeno recombinante del virus Zika está codificado mediante por lo menos una secuencia de ácido nucleico que codifica por lo menos una proteína E de un virus del Zika, o un fragmento funcional o variante de la misma. Adicionalmente, se proporcionan moléculas de ácido nucleico y un virus quimérico recombinante que codifica y/o que comprende antígenos seleccionados de entre un virus del Zika, o variantes del mismo, los cuales son adecuados como composiciones inmunógenas o de vacuna. Preferentemente, las secuencias que codifican por lo menos un antígeno de virus del Zika adecuado para provocar una respuesta inmunitaria están operativamente ligadas a una estructura principal del vector no derivada de flavivirus para proporcionar una estructura principal del vector eficiente y segura para la producción de vacunas y la vacunación. En ciertas formas de realización, la molécula de ácido nucleico o la composición inmunógena no codifica/contiene cápside o proteínas no estructurales derivadas de un virus del Zika distintas de una proteína E/prM de virus del Zika o fragmentos funcionales o variantes de la misma. Adicionalmente, se proporcionan métodos para purificar las partículas de virus quimérico recombinante o la composición inmunógena para proporcionar una composición inmunógena con un bajo nivel de impurezas relacionadas con el proceso o producto. Finalmente, se proporciona una composición inmunógena, preferentemente una composición de vacuna, para su uso en un método para prevenir o tratar una enfermedad del virus del Zika en un sujeto.

### 25 Antecedentes de la invención

Las enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes representan una amenaza constante para la salud pública en lugar de todos los esfuerzos mundiales de vacunación. En particular, fenómenos tales como el cambio climático en curso, la mayor movilidad de las poblaciones humanas, la modificación ambiental y el uso generalizado e imprudente de los antimicrobianos son factores que contribuyen al problema de la erradicación de las infecciones virales, microbianas y otras infecciones patógenas.

El virus del Zika es un virus emergente transmitido por mosquitos que se identificó por primera vez en Uganda en 1947, en monos rhesus, a través de una red de monitorización de la fiebre amarilla selvática. Posteriormente, se identificó en humanos en 1952, en Uganda y la República Unida de Tanzania. Se han registrado brotes de la enfermedad del virus del Zika en África, América, Asia y el Pacífico. Recientemente, el virus del Zika alcanzó una desafortunada notoriedad debido a un brote en América del Sur, América Central y el Caribe. A su vez, la OMS declaró que el virus del Zika constituye una emergencia de salud pública de importancia internacional, particularmente debido al hecho de que el virus del Zika probablemente se transmita de una mujer embarazada a su feto. Se han recibido informes de un grave defecto congénito del cerebro denominado microcefalia en bebés de madres que tuvieron el virus del Zika durante el embarazo. El conocimiento del vínculo entre el Zika y los defectos de nacimiento está evolucionando, pero hasta que se sepa más, las organizaciones de salud como el CDC recomiendan precauciones especiales para las mujeres embarazadas. Estos graves eventos representaron una llamada de atención para enfrentarse al hecho de que actualmente no existe una vacuna preventiva o un tratamiento curativo específico para combatir una infección por el virus del Zika. Aunque los síntomas asociados con una infección por el virus del Zika suelen ser muy leves, el riesgo para las mujeres embarazadas representa una amenaza excepcional asociada con esta enfermedad viral. Además, asimismo se sospecha un posible vínculo con la infección por Zika en adultos diagnosticados con el síndrome de Guillain-Barré, un raro trastorno autoinmunitario que puede causar parálisis. Por lo tanto, existe una gran necesidad de proporcionar vacunas seguras que provoquen una respuesta inmunitaria protectora para protegerse contra la enfermedad del virus del Zika. Se informó de los brotes de la enfermedad del virus del Zika por primera vez desde el Pacífico en 2007 y 2013 (Yap y la Polinesia Francesa, respectivamente), y en 2015 desde las Américas (Brasil y Colombia) y África (Cabo Verde). Además, más de 13 países en las Américas han informado de infecciones esporádicas por el virus del Zika, lo que indica una rápida expansión geográfica del virus del Zika. De acuerdo con un informe reciente de la OMS de diciembre de 2016, el virus del Zika continúa propagándose geográficamente a áreas en las que los vectores competentes están presentes. Aunque se ha informado de una disminución en los casos de infección por Zika en algunos países, o en algunas partes de los países, se debe mantener una vigilancia elevada. En la actualidad, 75 países y territorios han informado de evidencias de transmisiones de virus del Zika transmitidas por mosquitos desde 2007, 69 con informes de 2015 en adelante. 12 países han informado de evidencia de transmisión de persona a persona del virus del Zika. 28 países o territorios han informado de microcefalia y otras malformaciones del SNC potencialmente asociadas con la infección por el virus del Zika o que sugieren infección congénita. Estos datos demuestran la propagación geográfica actual del virus del Zika y sustentan la necesidad de desarrollar vacunas seguras que brinden protección contra la infección por el virus del Zika.

El virus del Zika pertenece al género *Flavivirus* dentro de la familia de *Flaviviridae*. Los flavivirus son virus pequeños, encapsulados, de ARN de cadena positiva que generalmente se transmiten por mosquitos y garrapatas infectados. Varios flavivirus, tales como la fiebre amarilla, el dengue, la encefalitis japonesa, la encefalitis

transmitida por garrapatas, el virus del dengue, el virus de la encefalitis de San Luis y los virus del Nilo Occidental, representan amenazas actuales o potenciales para la salud pública mundial. El virus de la fiebre amarilla, por ejemplo, ha sido la causa de epidemias en ciertos lugares de la selva del África subsahariana, así como en algunas partes de Sudamérica. Aunque muchas infecciones por el virus de la fiebre amarilla son leves, la enfermedad  
 5 asimismo puede causar una enfermedad grave y potencialmente mortal. La fase inicial o aguda del estado de enfermedad de ciertas enfermedades de Flavivirus normalmente se caracteriza por: fiebre alta, escalofríos, dolor de cabeza, dolor de espalda, dolor muscular, pérdida de apetito, náuseas y vómitos. El vector que transmite el virus del Zika a los seres humanos suele ser un mosquito del género *Aedes*. Los miembros del género *Aedes* son  
 10 vectores conocidos de numerosas infecciones virales. Las dos especies más importantes que transmiten virus son *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*, que transmiten los virus que causan el dengue, la fiebre amarilla, la fiebre del Nilo Occidental, la chikungunya, la encefalitis equina del este, o la enfermedad del virus del Zika.

Con respecto a la enfermedad causada por el virus del Zika, los síntomas suelen ser fiebre, erupción cutánea, dolor en las articulaciones o conjuntivitis (ojos rojos). Otros síntomas comunes incluyen dolor muscular y dolor de  
 15 cabeza. Se desconoce el período de incubación (el tiempo desde la exposición a los síntomas) para la enfermedad del virus del Zika, pero es probable que sea de unos días a una semana. La enfermedad generalmente es leve y los síntomas duran de varios días a una semana. El virus del Zika por lo general permanece en la sangre de una persona infectada durante aproximadamente una semana, pero se puede encontrar durante más tiempo en algunas personas. Existe una primera evidencia de que el Zika puede transmitirse sexualmente. Dado que las  
 20 infecciones por el virus del Zika se han confirmado en varios bebés con microcefalia de Brasil, y que el período y la ubicación geográfica de los informes de lactantes con microcefalia coinciden con el brote de las infecciones por el virus del Zika en Brasil, existe una fuerte presunción de que el virus está asociado con esta patología.

Hamel, R. et al. (2015, J. Virol., 89, 8880–8896) demostraron que el virus del Zika, de manera similar al virus del dengue, parece usar el receptor de lectina de tipo C DC-SIGN y miembros de las familias TIM y TAM de receptores de fosfatidilserina en la superficie de la célula huésped para obtener acceso al citoplasma a través de endocitosis  
 25 mediada por el receptor. Por lo tanto, estos hallazgos respaldan que los fibroblastos dérmicos, los queratinocitos y las células dendríticas inmaduras pueden infectarse fácilmente y pueden apoyar la replicación viral.

La vacunación es uno de los métodos más antiguos, pero aún más efectivos para prevenir enfermedades infecciosas. Sin embargo, la erradicación de patógenos intracelulares, incluyendo los virus, y el tratamiento de ciertas enfermedades, tales como el cáncer, que requieren respuestas inmunitarias citotóxicas eficientes siguen siendo un desafío. Con respecto a los problemas de seguridad de las vacunas virales, los virus vivos atenuados (LAV) en especial se han utilizado durante mucho tiempo como vacunas eficaces para humanos y animales. Debido  
 30 a que los LAV derivan del patógeno que causa la enfermedad, pero se han atenuado de forma intencionada en condiciones de laboratorio, son adecuados para estimular una buena respuesta inmunitaria. Estos crecerán en un individuo vacunado, pero debido a que están atenuados, causarán una enfermedad nula o muy leve, pero seguirán siendo infecciosos. En la actualidad, existen varios LAV aprobados por la OMS, incluyendo una vacuna oral contra la polio, una vacuna contra el sarampión, un rotavirus y una vacuna contra la fiebre amarilla. Aún así, todavía existen varios problemas de seguridad y estabilidad en el contexto de los LAV, que aún contienen material potencialmente infeccioso, entre otros asuntos relacionados con problemas como la reversión, pureza y posibles  
 35 contaminaciones en la preparación viral utilizada como vacuna y similares.

Con respecto a los LAV, el documento EP 1 939 214 B1 divulga que los virus de ARN vivos atenuados, especialmente la vacuna contra el sarampión, se han utilizado en cientos de millones de niños y se ha demostrado que son efectivos y seguros. Esta vacuna induce inmunidad de por vida después de una o dos inyecciones. Se produce fácilmente a gran escala y a bajo coste en la mayoría de los países. Estas ventajas hacen que el virus del sarampión, especialmente cepas de vacunas atenuadas, sea un buen vector candidato para inmunizar a los niños. El virus del sarampión (MV) pertenece al género *Morbillivirus* en la familia *Paramyxoviridae*. Se trata de un virus encapsulado con un genoma de ARN no segmentado de polaridad negativa (15,894 pb). El sarampión únicamente puede contraerse una vez, ya que el sistema inmunitario organiza una fuerte respuesta específica y establece una memoria de por vida que protege contra la reinfección. Dicha protección se basa tanto en la producción de anticuerpos como en la memoria de los linfocitos T CD8+ citotóxicos (LTC). Las cepas patógenas alteran fuertemente la hematopoyesis (Arneborn et al., 1983; Kim et al., 2002; Okada et al., 2000) lo que da como resultado una inmunosupresión transitoria responsable de la mayoría de las muertes debidas a la infección por sarampión en los países en desarrollo. A diferencia de las cepas primarias, las cepas atenuadas no inducen inmunosupresión (Okada et al., 2001). La cepa Edmonston del virus del sarampión se aisló en 1954 mediante el cultivo en células humanas primarias (Enders et al., 1954). La adaptación a fibroblastos embrionarios de pollo produjo semillas de vacuna que se atenuaron adicionalmente mediante pases posteriores en fibroblastos embrionarios de pollo (Schwarz et al., 1962). Las cepas de Schwarz y Moraten que poseen secuencias de nucleótidos idénticas (Parks et al., 2001a, Parks et al., 2001 b) constituyen la vacuna contra el sarampión utilizada con mayor frecuencia. La vacunación con una o dos inyecciones induce inmunidad de por vida (Griffin et al., 2001; Hilleman et al., 2002). Los inventores del documento EP 1 939 214 B1 han desarrollado un vector que usa el MV de Schwarz, la vacuna contra el sarampión más comúnmente utilizada en el mundo (Combredet et al., 2003). Este vector puede expresar  
 45 de forma estable diversos genes o una combinación de genes grandes durante más de 12 pases. Se produjeron vectores de MV recombinantes que contienen 4,000-5,000 nucleótidos adicionales, que representan un 30%

adicional de genoma. Estos virus se produjeron en cultivo celular con títulos comparables al MV estándar. Para optimizar el rendimiento del sistema de genética inversa, el ADNc viral antígenico se colocó bajo el control del promotor de la ARN polimerasa del fago T7 con un motivo GGG adicional requerido para una eficacia óptima. Para permitir la escisión exacta del ARN viral, se insertó una ribozima de cabeza de martillo entre el motivo GGG y el primer nucleótido viral, y se colocó la ribozima del virus de la hepatitis delta posterior al último nucleótido viral. El plásmido pTM-MV Schw resultante permitió la producción del virus correspondiente usando un sistema de genética inversa descrito previamente sobre la base de la transfección de células auxiliares humanas (Radecke et al., 1995). Además, en el documento EP 1 939 214 B1 se describe que el plásmido pTM-MV Schw se modificó para la expresión de genes extraños mediante la introducción de unidades de transcripción adicionales (ATU) en diferentes posiciones del genoma. Estas ATU son casetes de sitios de clonación múltiple insertados en una copia de la región N-P intergénica del genoma viral (que contiene las secuencias que actúan en cis necesarias para la transcripción).

Este vector de sarampión recombinante e infeccioso base permite el diseño de vacunas combinadas basadas en una cepa de vacuna viva atenuada de modo que el vector del virus del sarampión recombinante se utiliza como un andamiaje para la introducción, producción y purificación de partículas virales infecciosas que expresan epítotos distintos de los derivados de una cepa del virus del sarampión.

El documento EP 1 599 495 B9 divulga un ejemplo para un virus recombinante adecuado como vacuna basado en un virus del sarampión defectuoso o vivo atenuado. La patente divulga un virus recombinante que comprende y, por lo tanto, puede expresar antígenos de un virus del Nilo Occidental o un antígeno del virus del dengue. Cabe destacar que tanto el virus del Nilo Occidental como el virus del dengue son flavivirus. Por lo tanto, estos enfoques demuestran que el andamiaje del virus del sarampión se puede utilizar para desarrollar una vacuna contra flavivirus, por supuesto, dado el tiempo necesario para el diseño y las pruebas asociados con la producción de cualquier vacuna nueva, se deben cumplir dos requisitos principales: (1) debe ser capaz de provocar una respuesta inmunitaria efectiva y, por lo tanto, protectora; y (2) debe ser segura, es decir, sin efectos secundarios que pongan en peligro la salud de un sujeto que debe ser tratado.

Otra alternativa adecuada para proporcionar una estructura de la estructura principal para expresar proteínas de flavivirus se divulga en el documento EP 2 371 966 B1, que divulga un vector lentiviral recombinante para la expresión de una proteína de un *Flaviviridae* y sus aplicaciones como una vacuna diseñada para la prevención y/o el tratamiento de una infección con un virus de la familia *Flaviviridae*, en una especie sensible (huésped o reservorio).

Ninguna de las técnicas citadas anteriormente revela o sugiere una composición inmunógena del virus del Zika, o cómo podría establecerse una vacuna protectora contra el virus del Zika satisfaciendo las necesidades de seguridad, inmunidad protectora y amplia disponibilidad según lo exige el temor actual de que el virus del Zika, sobre la base de la globalización mejorada y asimismo en la creciente esfera de influencia de las regiones en las que se pueden detectar mosquitos *Aedes*, podría expandir rápidamente su expansión geográfica y así potencialmente atacar a las poblaciones inmunológicamente desprovistas de cualquier defensa adquirida contra dicha enfermedad viral.

Los viriones de flavivirus completamente procesados y maduros generalmente contienen tres proteínas estructurales, cápside (C), membrana (M) y envoltura (E), y siete proteínas no estructurales, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5. El interior del virión consiste en una nucleocápside isométrica que contiene el genoma de ARN de cadena positiva no segmentado complejado con la proteína C de la cápside. La superficie externa contiene dos proteínas ancladas a la membrana: la glicoproteína de envoltura (E), que media la fusión en el compartimento endosómico después de la endocitosis, y la proteína de membrana pequeña M (ver Monath et al., 1996, *Flaviviruses*, p. 961-1034). El ARN genómico de los flavivirus se combina con varias copias de la proteína C de la cápside para formar la nucleocápside. Esta cápside está rodeada por una envoltura viral que consiste en una doble capa lipídica derivada de las membranas del retículo endoplásmico (RE) de la célula huésped, en la que están ancladas la proteína E de la envoltura y la proteína M de la membrana. El ARN genómico de los flavivirus generalmente contiene un solo marco de lectura abierto, flanqueado por dos regiones cortas no codificantes en sus extremos 5' y 3'. El genoma se traduce en una poliproteína, que representa el precursor de las tres proteínas estructurales C, prM (precursor intracelular de M o proteína premembrana) y E, en su porción N-terminal, y de por lo menos cinco proteínas no estructurales (NS) NS1 a NS5, en su porción C-terminal. Los flaviviriones inmaduros que se encuentran en las células infectadas contienen proteína prM. La síntesis de la poliproteína es seguida por una serie compleja de escisiones proteolíticas postraduccionales de la poliproteína, para generar proteínas virales maduras (Amberg et al., *J. Virol.* 73: 8083-8094, 1999; Rice, "Flaviviridae", en *Virology*, Fields (ed.), Raven-Lippincott, New York, 1995, Volumen I, p. 937). Las proteínas estructurales del virus están dispuestas en la poliproteína en el orden C-prM-E. La superficie del virus está compuesta por las proteínas M y E. Hasta el momento, la información sobre la proteína E soluble flaviviral y la prM de los flavivirus y su función están disponibles para las proteínas E y/o prM del virus de la encefalitis transmitida por garrapatas ("TBEV") (ver, por ejemplo, Fritz et al., "The Unique Transmembrane Hairpin of Flavivirus Fusion Protein E Is Essential for Membrane Fusion", *J. Virol.* Mayo de 2011; 85(9): 4377-4385) o para el virus del Nilo Occidental (WNV) (ver, por ejemplo, Fritz et al., *ut supra*). Para el virus de la encefalitis japonesa (VEJ) (ver, por ejemplo, Konishi et al., "Generation and Characterization of a Mammalian Cell Line Continuously Expressing Japanese Encephalitis Virus Subviral Particles", *J. Virol.* Marzo de

2001; 75(5): 2204–2212) o para el virus del dengue (ver, por ejemplo, White et al., “An Alphavirus Vector-Based Tetravalent Dengue Vaccine Induces a Rapid and Protective Immune Response in Macaques That Differs Qualitatively from Immunity Induced by Live Virus Infection”, *J Virol.* Marzo de 2013; 87(6): 3409–3424, o Quinan et al., “An intact signal peptide on dengue virus E protein enhances immunogenicity for CD8(+) T cells and antibody when expressed from modified vaccinia Ankara”, *Vaccine.* Mayo de 2014, 23;32(25):2972-9), se analizó el posible potencial inmunológico de las proteínas virales de estos flavivirus. Heinz et al. (*J of Virol.*, 1991, 5579-5583) describe una forma libre de anclaje y cristalizable en la membrana de la glicoproteína E de la envoltura de TBEV. Posteriormente, esta variante asimismo se denominó E soluble (sE) para este y otros flavivirus. Más específicamente, la forma sE describe la proteína E que carece de la región de tallo-anclaje (Stiasny et al., “The membrane-proximal “stem” region increases the stability of the flavivirus E protein postfusion trimer and modulates its structure”, *J. Virol.*, 2013, doi:10.1128/JVI.01283-13). Fritz et al. *ut supra* y Allison et al. (*J Virol.* Mayo de 2001; 75(9):4268-75) describen adicionalmente las llamadas partículas subvirales recombinantes (RSP) de TBEV como un sistema experimental, ya que esas RSP no infecciosas sin cápside de TBEV presentan unas características de fusión similares a las de los viriones completos y las modificaciones del anclaje de doble membrana están desacopladas de la función de secuencia de señal de la segunda hélice transmembrana (TM2) que sería necesaria para la replicación del virus, en la que la proteína E de TBEV se describe como que consiste en dos hélices transmembrana antiparalelas (TM1 y TM2).

Allison et al. (*J Virol.* 2001, *supra*) identificaron que un bucle CD altamente conservado de una proteína E de TBEV y secuencias de aminoácidos comprendidas por dicho bucle CD, con el bucle CD ubicado en la punta de cada subunidad podría ser importante para la actividad de fusión del virus con membranas objetivo. Además, se presenta un análisis mutacional que dilucida el papel de los residuos de aminoácidos conservados dentro del bucle CD.

El documento US 9.267.114 B2 divulga que la proteína E de los flavivirus usualmente comprende un ectodominio largo seguido de una región de tallo-anclaje. Las estructuras tridimensionales del ectodominio de la proteína E del flavivirus (aproximadamente 400 aminoácidos, excluyendo el tallo carboxi terminal y los dominios transmembrana) y sus formas dimericas y triméricas se han resuelto y proporcionado para las proteínas E de la encefalitis transmitida por garrapatas y virus del dengue, ambas en las conformaciones de prefusión y postfusión. Ver Bressanelli et al., “Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low- pH- induced membrane fusion conformation”, *EMBO J.* 12 1-12 (2004); Modis et al., “A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein”, *Proc Natl Acad Sci USA* 100 6986-6991 (2003) Epub, 20 de mayo de 2003; Modis et al., “Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion”, *Nature* 427 313-319 (2004); Modis et al., “Variable surface epitopes in the crystal structure of dengue virus type 3 envelope glycoprotein”, *J Virol* 79 1223-1231 (2005); y Rey et al., “The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution”, *Nature* 375 291-298 (1995), que se incorporan como referencia. El ectodominio forma un dímero alargado que está orientado paralelo a la membrana viral. En el dímero de cabeza a cola, cada monómero está compuesto por los dominios I, II y III. Los contactos de monómero en el dímero no son contiguos a lo largo de toda la longitud de la molécula. Existen dos orificios a lo largo del eje del dímero que ocupan el lugar de la prM escindida (ver Rey et al., *ut supra*). Más allá de dos hélices  $\alpha$  cortas en el dominio II, las cadenas  $\beta$  son predominantes en toda la molécula. Cada uno de los dominios I N-terminales ubicados centralmente contiene dos puentes disulfuro y porta una única cadena lateral de carbohidrato que protege el péptido de fusión localizado en la punta del dominio II y contribuye a la estabilidad global del dímero (ver Rey et al., *ut supra*). El dominio II, o el dominio de dimerización, presenta una estructura alargada similar a un dedo y está implicada en la interacción de monómero a monómero en dos loci distintos. El bucle distal se estabiliza mediante tres puentes disulfuro y forma la punta que contiene el péptido de fusión, que se ajusta en un bolsillo hidrófobo proporcionada por los dominios I y III del segundo monómero. Este contacto es en gran parte no polar y se compone de residuos de los dominios I y III en una subunidad y la punta del dominio II en la otra. El contacto en el centro, donde pueden apreciarse dos hélices  $\alpha$  prominentes, implica principalmente cadenas laterales hidrófilas del dominio II solamente. El dominio III contiene el extremo C y en el virión está conectado al tallo seguido por la región transmembrana que ancla el monómero en la membrana. Además, se describe que, a pesar de la divergencia en las secuencias de aminoácidos de las proteínas E de diferentes flavivirus, los 12 restos de cisteína se conservan absolutamente entre especies. Estos forman seis puentes disulfuro en la proteína E del virus del Nilo Occidental (ver Analysis of disulfides present in the membrane proteins of the West Nile flavivirus, *Virology* 156 127-137 (1987)) y se encontraron en las posiciones esperadas en las estructuras de rayos X de todas las proteínas E determinadas hasta la fecha.

El documento US 9.267.114 B2 se refiere a un flavivirus vivo atenuado que presenta por lo menos una mutación en la secuencia de interfaz de contacto de monómero central con respecto a una secuencia de tipo silvestre correspondiente, como la región correspondiente a los aminoácidos 256 a 260 en relación con la proteína de envoltura del virus del Nilo Occidental, de la cual se dice que disminuye la disociación del dímero formado por una proteína E de tipo silvestre de origen natural de un flavivirus. Sin embargo, en el documento US 9.267.114 B2 no se menciona en absoluto nada relativo a las secuencias del virus del Zika, el diseño específico de una secuencia de ácido nucleico del virus del Zika o una composición inmunológica derivada del mismo, que no comprende tales mutaciones potencialmente atenuantes en las posiciones de aminoácidos 256 a 260, ya que una mutación en esta región asimismo puede influir críticamente en la formación de RSP y partículas virales, lo que puede obstaculizar las estrategias de vacunación eficientes y la presentación de epítomos de proteínas virales a las células inmunitarias, siendo la última presentación clave para una estrategia de vacunación eficaz que proporcione una

inmunidad celular duradera.

Aún así, no se aprobó el virus del Zika atenuado para la vacunación y no existe un estudio sistemático que analice la función de las proteínas o preproteínas del virus del Zika y las correspondientes secuencias de señal/péptidos para lograr anticuerpos neutralizantes y/o una respuesta específica de células T mediante la definición de epítomos derivados del virus del Zika que sean altamente estables y simultáneamente adecuados para presentarse al sistema inmunitario de un sujeto durante la inmunización para que se pueda desencadenar una respuesta inmunitaria adecuada, en las que las proteínas o preproteínas del virus del Zika se aíslan de su contexto genómico natural y se presentan en otra estructura principal del vector, preferentemente una estructura principal del vector distinta de una estructura principal del vector derivada de flavivirus, para proporcionar una composición de vacuna segura y eficaz.

Stiasny et al. 2013 supra divulga que la proteína E del virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBEV) forma trímeros de una manera más estable debido a la parte N-terminal del tallo, que asimismo modula la estructura del trímero fuera del sitio de interacción del tallo. Para este propósito, los trímeros E de TBEV con diferentes truncamientos C-terminales se analizaron utilizando dos estrategias: (i) evaluación del impacto de la presencia del tallo, así como sus partes, sobre la termoestabilidad de los trímeros E, y (ii) examen de las posibles influencias de las interacciones del tallo sobre la estructura del trímero E con anticuerpos monoclonales (MAb) específicos de la conformación. Sin embargo, no existe ninguna divulgación sobre el virus del Zika ni sobre la generación de composiciones de vacunas del virus del Zika adecuadas.

Para finalmente llevar al mercado una preparación de vacuna basada en virus, especialmente cuando el vector viral codifica por lo menos un antígeno de un patógeno viral aún no aprobado para terapia, no únicamente se requiere el suministro de partículas de virus infeccioso recombinante adecuadas para provocar una respuesta inmunitaria deseada, asimismo es necesario proporcionar cantidades suficientes, preparaciones estables y en una forma farmacéutica que no contenga contaminantes residuales de ADN y proteínas de la célula huésped como restos de la producción de las partículas de virus infecciosas en una célula huésped y el posterior aislamiento de las mismas y opcional tratamiento con enzimas como ADNasas. La OMS y las autoridades de aprobación nacionales y regionales responsables, tales como la FDA en los EE.UU. y la EMEA en Europa, imponen de forma comprensible altos requisitos a una composición utilizada como vacuna que comprenden ensayos clínicos y etiquetado para lograr la provisión de productos biológicos seguros. Las características importantes que debe cumplir un candidato a vacuna son su seguridad, pureza y potencia. Con respecto a las impurezas relacionadas con el producto o el proceso, en 1986 se convocó a un Grupo de Estudio de la OMS en Ginebra para debatir los problemas de seguridad con el uso de líneas celulares continuas para la producción de productos biológicos. Las conclusiones de las discusiones con respecto al ADN fueron que, para los productos biológicos fabricados en líneas celulares continuas, la cantidad de ADN por dosis parenteral debe ser de 100 pg o menos, un valor que se considera que representa un riesgo insignificante. Esta fue una decisión conservadora y se basó predominantemente en los resultados de los estudios sobre la actividad oncogénica del ADN del virus del poliovirus (ver FDA: FDA Briefing Document Vaccines and Related Biological Products Advisory Committee Meeting, 19 de septiembre de 2012). El valor de 100 pg de ADN de la célula huésped por dosis de vacuna se mantuvo como el estándar recomendado durante una década. Sin embargo, el tema se revisó en 1997 por varias razones. En primer lugar, los fabricantes de vacunas no siempre podrían alcanzar este nivel de ADN de sustrato celular residual para algunas vacunas virales, tales como con ciertos virus encapsulados, por ejemplo, el virus del sarampión. En segundo lugar, se disponía de más información sobre los eventos oncogénicos en cánceres humanos, en los que se estableció que se requieren múltiples eventos, tanto genéticos como epigenéticos (para literatura secundaria, ver FDA Briefing Document Vaccines and Related Biological Products Advisory Committee Meeting, 19 de septiembre de 2012). En tercer lugar, para líneas celulares continuas no tumorigénicas, tales como Vero, el principal sustrato celular que se estaba considerando en ese momento, la presencia de oncogenes dominantes activados en estas células era poco probable. Este último problema asociado con las células Vero se estudia actualmente con mayor detalle, y las líneas celulares recombinantes disponibles están bien caracterizadas y existen numerosos estudios, por ejemplo, en relación con el número de etapas adecuadas para usar estas líneas celulares específicas bajo condiciones controladas de manera sostenible. El resultado de la reunión de la OMS de 1997 fue que la cantidad de ADN celular residual permitido por dosis en una vacuna producida en una línea celular continua y una administrada por vía parenteral se elevó de 100 pg a 10 ng por dosis (Brown, F., E. Griffiths, F. Horaud y J. C. Petricciani (ed.). 1998. Safety of Biological Products Prepared from Mammalian Cell Culture, vol. 93. Karger, Basel). Debido a que aún existen dudas sobre las impurezas de ADN en las vacunas virales, existe una necesidad constante de establecer esquemas de purificación adecuados para la producción industrial de vacunas virales, especialmente para partículas virales encapsuladas, tales como el virus del sarampión, y productos basados en andamiajes del virus del sarampión para lograr un grado más alto de pureza y, por tanto, una mejor seguridad del producto resultante, de forma que las impurezas relacionadas con el producto, por ejemplo, ADN de la célula huésped contaminante, así como las impurezas relacionadas con el proceso, incluyendo las contaminaciones por el cultivo inherentemente necesario en una célula eucariota adecuada que necesita la adición de suplementos, incluyendo suero o proteinasas, se elimina de manera eficaz durante la producción y opcionalmente la purificación para lograr un producto médico aceptable.

Por lo tanto, existe una necesidad urgente de proporcionar composiciones inmunógenas o vacunas adecuadas

que protejan a un sujeto contra la infección por el virus del Zika, preferentemente contra la infección con diferentes aislados del virus del Zika, en las que las composiciones inmunógenas o vacunas provocan una respuesta inmunitaria protectora contra el virus del Zika, presentan alta seguridad y pureza, y pueden fabricarse de una manera sensible a los costes para permitir la provisión de una vacuna segura. Particularmente, es un objetivo proporcionar antígenos o epítomos de virus del Zika adecuados para la utilización en una composición inmunógena o de vacuna, preferentemente en una forma quimérica recombinante, de modo que se pueda proporcionar un virus recombinante quimérico atenuado y controlable, en la que la composición inmunógena o de vacuna puede producirse como vacuna recombinante, mientras que todos las etapas de producción pueden realizarse bajo condiciones de GMP para definir nuevos candidatos a vacunas y vacunas para prevenir la enfermedad del virus del Zika, en la que actualmente no se cuenta con un tratamiento profiláctico y/o terapéutico. Además, debido a la posible actividad neurotrópica y/o viscerotrópica de ciertos aislados del virus del Zika, era un objetivo presentar una composición inmunógena o de vacuna basada en una molécula de ácido nucleico que codifica un virus recombinante quimérico que únicamente comprende antígenos seleccionados de entre el virus del Zika y ninguna cadena completa del virus del Zika, particularmente ninguna proteína no estructural o la proteína C estructural derivada del virus del Zika u otro flavivirus, y opcionalmente ciertas mutaciones, inserciones y deleciones atenuantes para garantizar la seguridad del producto de la vacuna resultante.

### Sumario de la invención

Los objetos identificados anteriormente se resuelven mediante la enseñanza técnica tal como se proporciona con la presente invención.

En un primer aspecto, se proporciona una composición inmunógena que comprende por lo menos una partícula de virus de sarampión infecciosa, en la que la partícula de virus infecciosa comprende una estructura principal de vector de virus de sarampión y una proteína E de virus del Zika o un fragmento funcional de una proteína E de un virus del Zika, en la que la partícula de virus de sarampión infecciosa comprende como su genoma dos secuencias de ácido nucleico, en la que la primera secuencia de ácido nucleico es una secuencia que codifica una proteína E de un virus del Zika o un fragmento funcional de una proteína E de un virus del Zika, y en la que la primera secuencia de ácido nucleico está ligada funcionalmente a una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende la estructura principal de vector de virus de sarampión, en la que la composición inmunógena comprende opcionalmente por lo menos un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente y/o veterinariamente aceptables, en la que la composición inmunógena no comprende una secuencia de ácido nucleico adicional que codifica una proteína no estructural de un flavivirus; y (a) en la que la primera secuencia de ácido nucleico comprende, en orden secuencial, (i) una secuencia de ácido nucleico que codifica dos residuos de aminoácidos básicos, en la que los dos residuos de aminoácidos básicos presentan la secuencia arginina-arginina, (ii) una secuencia que codifica una secuencia de señal para una proteína premembrana de un virus del Zika o para un fragmento funcional de una proteína premembrana de un virus del Zika, (iii) una secuencia que codifica una proteína premembrana de un virus del Zika o un fragmento funcional de la misma, (iv) una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de señal para una proteína E de una proteína E de virus del Zika o para un fragmento funcional de una proteína E de un virus del Zika, y (v) una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína E de virus del Zika o un fragmento funcional de una proteína E de un virus del Zika, y (vi) en la que la primera secuencia de ácido nucleico no comprende una secuencia que codifica una región de tallo-anclaje de una proteína E de un virus del Zika, o una región de tallo-anclaje heteróloga para una proteína E de un virus del Zika; o (b1) en la que la primera secuencia de ácido nucleico comprende, en orden secuencial, (i) una secuencia de ácido nucleico que codifica dos residuos de aminoácidos básicos, en la que los dos residuos de aminoácidos básicos presentan la secuencia arginina-arginina, (ii) una secuencia que codifica una secuencia de señal para una proteína premembrana de un virus del Zika o para un fragmento funcional de una proteína premembrana de un virus del Zika, (iii) una secuencia que codifica una proteína premembrana de un virus del Zika o un fragmento funcional de la misma, (iv) una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de señal para una proteína E de una proteína E de virus del Zika o para un fragmento funcional de una proteína E de un virus del Zika, y (v) una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína E de un virus del Zika o un fragmento funcional de la misma que presenta una mutación en la posición de aminoácido 107 en comparación con la secuencia de SEC ID N°: 40 a 52 o 130 a 150 que representan proteínas E de tipo salvaje de un virus del Zika, y (vi) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una región de tallo anclaje de una proteína E de un virus del Zika, o una región de tallo-anclaje heteróloga para una proteína E de un virus del Zika; o (b2) en la que la primera secuencia de ácido nucleico es como se define en (b1) y comprende una mutación L107D en comparación con la secuencia de SEC ID N°: 40 a 52 o 130 a 150 en la proteína E de un virus del Zika o el fragmento funcional de la misma que se codifica por la primera secuencia de ácido nucleico; o (c) en la que la primera secuencia de ácido nucleico comprende, en orden secuencial, (i) una secuencia de ácido nucleico que codifica dos residuos de aminoácidos básicos, en la que los dos residuos de aminoácidos básicos presentan la secuencia arginina-arginina, (ii) una secuencia que codifica una secuencia de señal para una proteína premembrana de un virus del Zika o para un fragmento funcional de una proteína premembrana de un virus del Zika, (iii) una secuencia que codifica una proteína premembrana de un virus del Zika o un fragmento funcional de la misma, (iv) una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de señal para una proteína E de una proteína E de virus del Zika o para un fragmento funcional de una proteína E de un virus del Zika, (v) una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína E de virus del Zika o un fragmento funcional de una proteína E de un virus del Zika, y (vi) una secuencia

- 5 de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una región de tallo anclaje de una proteína E de un virus del Zika, o una región de tallo-anclaje heteróloga para una proteína E de un virus del Zika, en la que la primera secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en SEC ID N°: 53 a 56, o una secuencia que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% a las mismas siempre que la secuencia homóloga codifique todavía por lo menos un antígeno de virus del Zika funcional.
- 10 En una forma de realización del aspecto anterior, se proporciona una composición inmunógena, en la que la estructura principal del vector es de una cepa del virus del sarampión de virus atenuado, siendo la cepa del virus del sarampión seleccionada de entre el grupo que consiste en la cepa Schwarz, la cepa Zagreb, la cepa AIK-C y la cepa Moraten, preferentemente en la que la estructura principal del vector comprende una secuencia según cualquiera de SEC ID N°: 59, 60 o 192.
- 15 En otra forma de realización del aspecto anterior, se proporciona una composición inmunógena, en la que la composición inmunógena comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en SEC ID N°: 53 a 58 o una secuencia de ácido nucleico que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% a las mismas siempre que la secuencia homóloga, opcionalmente tras la expresión, codifique todavía por lo menos un antígeno de virus del Zika funcional.
- 20 En un segundo aspecto, se proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende una primera secuencia de ácido nucleico como se define en la reivindicación 1 parte (a), (b1), (b2), o (c).
- 25 En una forma de realización del aspecto anterior, se proporciona una molécula de ácido nucleico, en la que la primera secuencia de ácido nucleico se selecciona de entre el grupo que consiste en SEC ID N°: 53 a 56 o una secuencia que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% a las mismas siempre que la secuencia tras la expresión codifique todavía un antígeno de virus del Zika.
- 30 En un tercer aspecto, se proporciona una partícula de virus de sarampión infecciosa como se define según el primer aspecto anterior.
- Todavía en otro aspecto, se proporciona una célula huésped que comprende una molécula de ácido nucleico según el segundo aspecto anterior, o que comprende una partícula de virus de sarampión infecciosa según el tercer aspecto anterior.
- 35 Todavía en un aspecto adicional, se proporciona un método para producir una partícula de virus de sarampión infecciosa según un tercer aspecto, o para producir una composición inmunógena de acuerdo con el primer aspecto, comprendiendo el método las etapas siguientes:
- 40 (i) insertar una primera secuencia de ácido nucleico tal como se define según el primer aspecto en la parte (a), (b1), (b2), o (c) en una estructura principal de vector de sarampión como se define según el primer aspecto para ligar operativamente la secuencia de ácido nucleico y la estructura principal del vector para obtener una secuencia de virus quimérico recombinante; (ii) infectar por lo menos una célula huésped con por lo menos una secuencia de virus quimérico recombinante obtenida en la etapa (i) para obtener una muestra de virus; (iii) clarificar la muestra de virus de la etapa (ii); (iv) purificar la muestra de virus clarificado de la etapa (iii); (v) opcionalmente: formular el por lo menos un virus quimérico recombinante con por lo menos un vehículo y/o excipiente farmacéutica y/o veterinariamente aceptable; (vi) obtener la partícula de virus de sarampión infecciosa, o la composición inmunógena.
- 45
- 50 En una forma de realización del aspecto mencionado anteriormente, se proporciona un método que comprende una etapa de purificación (iv), en el que la etapa de purificación comprende la purificación por medio de cromatografía, opcionalmente, en el que la purificación es seguida por una etapa de pulido adicional.
- 55 En otra forma de realización del aspecto mencionado anteriormente, se proporciona un método, en el que la célula huésped se selecciona de entre el grupo que consiste en células Vero, células de fibroblasto de embrión de pollo, células HEK293, células HeLa, células pulmonares de mono rhesus fetal o células MRC5.
- Todavía en otra forma de realización del aspecto mencionado anteriormente, se proporciona un método, en el que el método comprende una etapa adicional, que comprende (vii) separar las partículas subvirales recombinantes de las partículas infecciosas.
- 60
- Otros aspectos y formas de realización de la presente invención pueden derivarse de la siguiente descripción detallada, las figuras, el listado de secuencias, así como el juego de reivindicaciones adjunto.
- 65



### Breve descripción de las figuras

La figura 1 es un dibujo esquemático que representa, en la imagen superior, la arquitectura de la parte N-terminal de una poliproteína ejemplificativa del virus del Zika. El término prM indica una secuencia de proteína premembrana. TM indica un segmento transmembrana. NS1 representa una abreviatura para la proteína no estructural 1 de un virus del Zika. La imagen inferior representa un dibujo esquemático de la E soluble (sE) de Zika y la construcción de la partícula subviral recombinante (RSP) de Zika, comprendiendo la construcción de RSP una mutación ejemplificativa de leucina a ácido aspártico en la posición 107. Las secuencias de Kozak y de terminación se muestran para la sE y para la construcción de RSP.

### Definiciones

Como se utilizan en la presente memoria, una “partícula viral”, “partícula de virus” o “partícula de virus infecciosa recombinante” se refieren a una única partícula derivada de un ácido nucleico viral, que se ubica fuera de una célula. La partícula viral representa la forma madura e infecciosa de un virus. Debido a que la partícula viral contiene información genética, es capaz de replicarse y/o puede propagarse en una célula huésped susceptible. Dependiendo de la complejidad de un virus, la partícula viral comprende secuencias de ácidos nucleicos y polipéptidos y, opcionalmente, lípidos, preferentemente en forma de una membrana lipídica derivada de la célula huésped.

Como se utiliza en la presente memoria, un “virión” se refiere a una única partícula derivada de un ácido nucleico viral, que se ubica fuera de una célula que contiene ácidos nucleicos y de este modo puede replicarse o transcribirse en una célula huésped adecuada.

Como se utilizan en la presente memoria, una “partícula similar a virus” o “VLP”, se refieren a por lo menos una partícula de virus que no contiene ningún ácido nucleico. Las VLP generalmente comprenden por lo menos una proteína estructural viral de un virus del que derivan y, opcionalmente, constituyentes lipídicos. Como tales, pueden usarse para la vacunación o para inducir una reacción inmunógena en un sujeto, sin embargo, debido a la ausencia de ácidos nucleicos, no serán capaces de replicarse en una célula huésped y, por lo tanto, no son replicativos.

Como se utilizan en la presente memoria, una “partícula subviral recombinante” o “RSP” se refieren a por lo menos una partícula de virus, particularmente una partícula derivada de flavivirus, que no es infecciosa y comprende las proteínas E y premembrana (prM) de envoltura, pero no (nucleo)cápside. Por lo tanto, las RSP normalmente comprenden las proteínas de la superficie viral de un virus del que derivan y, opcionalmente, los constituyentes lipídicos pueden usarse para la vacunación o para inducir una reacción inmunógena en un sujeto, sin embargo, debido a la ausencia de ácidos nucleicos, no serán capaces de replicarse en una célula huésped. De este modo, se entiende que las VLP y las RSP de acuerdo con la presente invención representan partículas que carecen de información genética y, por lo tanto, no son replicativas. Las VLP en sí son, por lo tanto, no infecciosas en el sentido de que no pueden replicarse en una célula para dar lugar a nuevas partículas virales y, por lo tanto, extenderse a otras células después de un ciclo de replicación. Aún así, las VLP, después de su ensamblaje y sobre la base de las moléculas expuestas en su superficie, pueden interactuar con una célula huésped y/o moléculas de la célula huésped, por ejemplo, receptores superficiales, o, después de la captación y/o procesamiento por una célula inmunitaria, por ejemplo, una célula que representa un antígeno, epítopos o antígenos comprendidos por una VLP pueden presentarse o presentarse de forma cruzada mediante la célula inmunitaria a las células efectoras. Por medio de esta interacción, las VLP pueden inducir una respuesta inmunitaria en un organismo. Esta capacidad hace que las VLP sean estructuras adecuadas para la provisión de composiciones inmunógenas o de vacuna seguras.

Una “muestra de virus”, un “material de virus” o similar se refiere a un material que comprende por lo menos uno de una partícula de virus (infecciosa y recombinante) y/o un virión y/o una VLP y/o una RSP.

Como se utiliza en la presente memoria, una “composición inmunógena” se refiere a una composición que puede inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto. Una composición inmunógena de acuerdo con la presente divulgación generalmente comprende por lo menos una composición de vacuna que comprende por lo menos un epítopo de virus del Zika y una plataforma de estructura principal del vector adecuada. Por lo tanto, una vacuna o composición de vacuna *per se* asimismo están comprendidas por el término composición inmunológica. Sin embargo, es bien conocido por el experto en la materia que, para ser adecuada para la administración a un animal, una composición inmunógena puede comprender adicionalmente vehículos farmacéutica y/o veterinariamente aceptables adecuados.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “composición de vacuna” se refiere a una composición, preferentemente basada en una partícula de virus y/o una VLP o RSP, que es capaz de inducir una respuesta inmunitaria protectora en un sujeto.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “respuesta inmunitaria” se refiere a una respuesta inmunitaria adaptativa, por ejemplo, la respuesta de células T o el aumento de los niveles séricos de anticuerpos como

resultado de la exposición a un antígeno debido a una respuesta de las células B, o la presencia de anticuerpos neutralizantes contra un antígeno, o se refiere a una respuesta inmunitaria innata, por ejemplo, mediada por el sistema del complemento y las células del sistema inmunitario innato, tales como macrófagos o células dendríticas. Asimismo se refiere a una respuesta alérgica, que incluye, entre otros, mastocitos, eosinófilos o acción de células NK, células T y anticuerpos secretados por células B. El término respuesta inmunitaria se debe entender que incluye una respuesta humoral y/o una respuesta celular y/o una respuesta inflamatoria.

Como se utiliza en la presente memoria y comúnmente en el campo de la inmunología, el término “antígeno” se refiere a una molécula “generadora de anticuerpos”, es decir, una sustancia, que puede provocar una respuesta inmunitaria adaptativa. Por lo tanto, un antígeno es una molécula que se une a un receptor específico de antígeno, ya sea un receptor de células T o de células B. Un antígeno suele ser un (poli)péptido, pero asimismo puede ser un polisacárido o un lípido, posiblemente combinado con una molécula portadora de proteína o polisacárido. A los efectos de los diversos aspectos y formas de realización de la presente invención, el antígeno es un (poli)péptido, es decir, una secuencia de aminoácidos. En el caso de la unión a un receptor de células T, el antígeno se presenta al receptor de células T respectivo a través de una célula presentadora de antígeno como un péptido antigénico unido a una molécula de histocompatibilidad en la superficie de la célula presentadora de antígeno, en el que el péptido antigénico ha sido procesado previamente por la célula presentadora de antígeno. La presentación de antígenos por células profesionales presentadoras de antígenos (APC) es la primera etapa hacia el inicio de una respuesta inmunitaria adaptativa llevada a cabo por linfocitos T sin exposición previa. Por lo tanto, como se utiliza en la presente memoria, un “antígeno” se refiere a una molécula, tal como una proteína o un polipéptido, que comprende uno o más epítopos que estimularán el sistema inmunitario del huésped para producir una respuesta humoral y/o celular específica del antígeno. Como tal, un antígeno puede ubicarse en la porción expuesta en la superficie de un virus infeccioso recombinante o una RSP de acuerdo con la presente invención. Un antígeno asimismo puede hacerse accesible al sistema inmunitario de un sujeto después del procesamiento de un virus infeccioso recombinante o una RSP de acuerdo con la presente invención y posteriormente puede cargarse en una molécula de MHC para presentarse a una célula T para provocar una respuesta inmunitaria.

Como se utiliza en la presente memoria, un “epítipo” puede ser un epítipo conformacional o un epítipo lineal. Un epítipo conformacional es una secuencia de subunidades, generalmente aminoácidos, que componen un antígeno que entra en contacto directo con un receptor del sistema inmunitario. Un antígeno es cualquier sustancia que el sistema inmunitario puede reconocer como extraña. Los antígenos son generalmente proteínas que son demasiado grandes para unirse en conjunto a cualquier receptor, por lo que únicamente los segmentos específicos, que forman el antígeno, se unen a un receptor específico, dichos segmentos generalmente se denominan “epítopos”. Del mismo modo, únicamente el paratopo del receptor de reconocimiento respectivo entra en contacto con el epítipo. Cuando un receptor interactúa con un antígeno no digerido, los aminoácidos de superficie que entran en contacto pueden no ser continuos entre sí si la proteína se desenrolla. Tales aminoácidos discontinuos que se unen en conformación tridimensional e interactúan con el paratopo del receptor se denominan epítopos conformacionales. Un epítipo lineal, o un epítipo secuencial, en cambio, es un epítipo que es reconocido por el receptor de antígeno correspondiente por su secuencia lineal de aminoácidos o estructura primaria.

Como se utilizan en la presente memoria, los términos “protección” o “inmunidad protectora” o “respuesta inmunitaria protectora” se refieren a la capacidad de una sustancia para inducir la producción de anticuerpos séricos (respuesta humoral adaptativa) y/o una respuesta celular durante la inmunización para proteger (parcial o totalmente) a un sujeto que ha sido tratado con la sustancia contra un virus de interés durante una infección posterior. De este modo, un animal inmunizado mediante las composiciones o vacunas de la invención experimentará posteriormente un crecimiento y propagación limitados si se infecta con el virus de origen natural respectivo. Además, una respuesta inmunitaria innata inducida mediada por células inmunitarias del sistema inmunitario innato, tales como macrófagos o células dendríticas, puede contribuir al efecto protector de una sustancia, en caso de que la sustancia estimule dicha respuesta inmunitaria innata, lo que a su vez puede contribuir a mejorar una respuesta inmunitaria adaptativa.

Como se utiliza en la presente memoria y en el campo de la inmunología, un “adyuvante” se refiere a una sustancia o composición que mejora la antigenicidad de otra sustancia. Esto se logra mediante la estimulación específica y el equilibrio principalmente de los subconjuntos Th1 y Th2 de las células T y, por lo tanto, sus moléculas efectoras. Normalmente, las composiciones inmunógenas basadas en virus vivos atenuados o muertos son altamente inmunógenas en sí y, por lo tanto, podría no ser necesario un adyuvante adicional, mientras que un adyuvante adicional podría ser aún favorable para equilibrar la respuesta inmunitaria provocada. Las células Th1 secretan IFN- $\gamma$ , que activa los macrófagos y, por lo tanto, induce la producción de anticuerpos opsonizantes por las células B. La respuesta Th1, por lo tanto, conduce principalmente a una inmunidad mediada por células. Las células Th2 secretan principalmente citocinas, incluyendo la IL-4, que induce a las células B a producir anticuerpos neutralizantes. Las células Th2 generalmente inducen una respuesta humoral (anticuerpo) crítica en la defensa contra patógenos extracelulares (helminths, microbios extracelulares y toxinas).

Como se utilizan en la presente memoria, los términos “modificado genéticamente”, “recombinante” o “ingeniería genética”/“diseñados genéticamente” se refieren a cualquier molécula de ácido nucleico y/o molécula de aminoácido o célula huésped que implica una manipulación y/o modificación dirigida e intencional lograda mediante

biología molecular o modificación de proteínas, por ejemplo, al introducir una secuencia heteróloga en otra célula huésped, modificar las secuencias de ácidos nucleicos de origen natural y similares. Las modificaciones adicionales incluyen, pero no se limitan a, una o más mutaciones puntuales, por ejemplo, para la modificación de proteínas dirigida o para la optimización de codones, deleciones, y una o más inserciones de por lo menos una molécula de ácido nucleico o aminoácido, modificación de una secuencia de aminoácidos, o una combinación de las mismas. Los términos asimismo pueden implicar una secuencia que, en sí misma, es de origen natural, pero se ha tratado de forma intencionada mediante biología molecular aislada de su entorno natural *in vitro*.

Como se utilizan en la presente memoria, los términos “célula huésped” o “población de células huésped” se refieren a por lo menos una, pero preferentemente más de una, célula(s) huésped. El término “célula huésped” comprende células no recombinantes, es decir, células que no se inmortalizaron, transformaron o manipularon de manera intencionada. El término célula huésped asimismo comprende las células huésped. Con el fin de que sean adecuadas en el contexto de la presente invención, la(s) célula(s) huésped de la población celular deben ser capaces de soportar el ciclo de replicación del virus del sarampión, es decir, la(s) célula(s) debe(n) ser susceptible(s) al virus del sarampión o la(s) célula(s) debe(n) adecuarse para el siguiente ciclo de propagación o replicación, incluyendo la replicación, la encapsidación de la traducción del ARN del virus, y la gemación de la célula huésped que se liberará como partícula de virus. Varias células huésped eucariotas cumplen con este propósito, y se citan en la presente memoria o son conocidas por los expertos.

Como se utilizan en la presente memoria, los términos “derivado”, “derivativo”, “derivado de”, “descendiente” o “progenitor”, en el contexto de una célula huésped, una población celular o una partícula de virus infecciosa o en el contexto de secuencias de ácido nucleico de acuerdo con la presente solicitud, se refieren a los descendientes de dicha célula huésped o partícula de virus infecciosa que resulta de la propagación reproductiva natural, incluyendo la propagación sexual y asexual, y, en el contexto de ácidos nucleicos del virus, la propagación del material genético del virus por la maquinaria de la célula huésped. Es bien conocido por los expertos en la materia que dicha propagación puede conducir a la introducción de mutaciones en el genoma de un organismo como resultado de fenómenos naturales que dan como resultado un descendiente o progenie que es genómicamente diferente de la célula huésped original, sin embargo, todavía pertenece al mismo género/especie y posee las mismas características que la célula huésped original. En el contexto de una secuencia de ácido nucleico o cualquier otra biomolécula que “deriva de” una cierta secuencia, por ejemplo, una secuencia tal como se muestra en el listado de secuencias de acuerdo con la presente solicitud, o como derivable de una base de datos correspondiente, o una secuencia derivada de una estructura de andamiaje, este término implica que la secuencia de ácido nucleico respectiva se basa en la secuencia de referencia del listado de secuencias, un número de acceso de la base de datos, o la respectiva estructura del andamiaje, es decir, que se origina a partir de dicha secuencia, mientras que la secuencia de referencia puede comprender más secuencias, por ejemplo, el genoma completo o una secuencia que codifica poliproteína completa de un virus, mientras que la secuencia “derivada de” la secuencia nativa únicamente puede comprender un gen aislado o un fragmento de función del mismo, o un fragmento coherente del mismo. De este modo, el experto en la materia puede definir fácilmente una secuencia “derivada de” una secuencia de referencia que, mediante el alineamiento de secuencia en el nivel de ADN o aminoácido, presentará una alta identidad con la secuencia de referencia respectiva y presentará tramos coherentes de ADN/aminoácidos en común con la secuencia de referencia respectiva (>75% de identidad de búsqueda, siempre que la secuencia derivada sea la búsqueda y la secuencia de referencia represente al sujeto durante una alineación de secuencia). Por lo tanto, un experto puede clonar las secuencias respectivas basándose en la descripción proporcionada en la presente memoria por medio de reacciones en cadena de la polimerasa y similares en un sistema de vector de interés adecuado, o usar una secuencia como un andamiaje del vector. Por lo tanto, el término “derivada de” no se trata de una secuencia arbitraria, sino una secuencia correspondiente a una secuencia de referencia de la que deriva, mientras que ciertas diferencias, por ejemplo, ciertas mutaciones de origen natural durante la replicación de una construcción recombinante dentro de una célula huésped, no pueden excluirse y, por lo tanto, están comprendidas por el término “derivado de”. En particular, en ciertos casos, por ejemplo, en relación con un “antígeno” de acuerdo con la presente invención, el término “derivado de” especifica una secuencia de ácido nucleico de la que se origina un antígeno (el antígeno es una secuencia de aminoácidos). Un experto es muy consciente del hecho de que esta secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención se transcribirá y traducirá *in vivo*, y se presentará a una célula inmunitaria, o se digerirá y/o procesará adicionalmente dentro de una célula huésped, de modo que el término “derivada de” indica precisamente la secuencia utilizada originalmente de acuerdo con la descripción de la presente invención. Por lo tanto, es más preciso definir un antígeno en un sentido técnico basado en la secuencia de ácido nucleico correspondiente que codifica dicho antígeno. En el contexto de un virus, el derivado, descendiente o progenitor puede poseer naturalmente una o más mutaciones. De este modo, dichos derivados o descendientes resultantes de fenómenos naturales durante la reproducción o propagación están comprendidos por el término célula huésped o población celular de acuerdo con la presente descripción, y un experto puede definir fácilmente, por medio de biología molecular, microscopía o similar, que el derivado o descendiente, de hecho, se deriva de una célula huésped original del mismo género. Estos términos, por lo tanto, no se refieren a ningún derivado, descendiente o progenitor arbitrario, sino a un derivado, descendiente o progenitor asociado filogenéticamente con, es decir, basado en, una célula original o virus o una molécula de estos, mientras que esta relación entre el derivado, descendiente o progenitor y el “original” es claramente deducible por un experto en la materia.

Como se utilizan en la presente memoria, los términos “fragmento” o “fragmento funcional”, en el contexto de aminoácidos/proteínas o secuencias de ácidos nucleicos, incluyendo secuencias de virus y vectores y andamiajes basados en dichos virus, se refieren a por lo menos un fragmento coherente que está compuesto en conjunto por la secuencia de referencia. Por lo tanto, los términos significan una porción o fragmento de un conjunto capaz de realizar, de manera total o parcial, una función del conjunto. Por ejemplo, una porción biológicamente funcional de una molécula significa una porción de la molécula que realiza una función biológica de la molécula completa o intacta, es decir, una secuencia de ácido nucleico o una secuencia de aminoácido, preferentemente una secuencia de antígeno, de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, una porción funcional de una secuencia de ácido nucleico o la proteína codificada es un fragmento o porción de la secuencia de ácido nucleico especificada o la proteína codificada que comprende por lo menos una parte coherente de la secuencia nativa o de tipo silvestre. Por lo tanto, los fragmentos funcionales son adecuados para fines de vacunación para centrarse en un subfragmento de una proteína completa para elegir específicamente las partes de interés inmunógeno. Como tal, un “fragmento funcional” en sí presenta una identidad de secuencia del 100% con el tramo respectivo de la secuencia de la que deriva a lo largo de una longitud de alineación dada. Aún así, un único nucleótido o aminoácido puede no ser inequívocamente atribuible a una estructura original. En términos de identidad de secuencia absoluta, un “fragmento funcional” de acuerdo con la presente invención, por lo tanto, no solo será 100% idéntico a una longitud dada sobre una alineación con la estructura original, sino que el “fragmento funcional” presentará por lo menos 15, por lo menos 20, por lo menos 25, por lo menos 30, por lo menos 35 o por lo menos 40 posiciones de ácido nucleico en común con la estructura original respectiva (en el nivel de ADN y/o aminoácido) de la que deriva. En caso de que la secuencia original comprenda por lo menos una mutación, el “fragmento funcional” asimismo puede comprender dicha(s) mutación(es), o el “fragmento funcional” puede comprender por lo menos una mutación adicional para optimizar sus propiedades (por ejemplo, tasa de expresión, características de plegado, presentación a las células inmunitarias, inmunogenicidad *in vitro* e *in vivo*) deseables de acuerdo con la presente divulgación. El fragmento, sin embargo, será más corto que la secuencia de la que deriva. De este modo, un fragmento funcional de acuerdo con la presente invención puede, por ejemplo, ser una proteína E soluble de un virus del Zika que carece de la región de tallo-anclaje. Un fragmento funcional puede estar truncado, es decir, es una versión más corta de una proteína de la que deriva, o de la secuencia de ácido nucleico correspondiente que codifica la proteína. El “fragmento funcional” puede comprender mutaciones puntuales adicionales para modular la función del mismo. A pesar de estar estructuralmente relacionado con la estructura parental, el “fragmento funcional” puede presentar propiedades inmunógenas alteradas, en función de su reconocimiento y procesamiento por parte del sistema inmunitario.

Como se utilizan en la presente memoria, los términos “quimérico”, un “virus quimérico” o una “partícula de virus quimérico (recombinante)” se refieren a cualquier partícula de virus, RSP o VLP, o una mezcla de los mismos que se origina a partir de una molécula de ácido nucleico que comprende secuencias de diferentes, es decir, por lo menos dos, organismos/virus o de una molécula recombinante que comprende secuencias de diferentes, es decir, por lo menos dos, organismos/virus, mientras que las partículas resultantes únicamente pueden comprender secuencias que se originan a partir de una especie viral, preferentemente secuencias derivadas de un virus del Zika, y las partículas que comprenden opcionalmente material derivado de la célula huésped después del procesamiento y la formación de partículas.

Como se utilizan en la presente memoria, los términos “atenuación” o “atenuado”, en conexión con una cepa de virus o un material derivado de los mismos, se refieren a un virus debilitado en condiciones de laboratorio que es menos vigoroso que el virus de tipo silvestre respectivo. Un virus atenuado puede usarse para preparar una vacuna que sea capaz de estimular una respuesta inmunitaria y crear inmunidad, pero no de causar la enfermedad.

Como se utilizan en la presente memoria, los términos “vector” o “vector plasmídico” definen un sistema que comprende por lo menos un vector adecuado para la transformación, transfección o transducción de una célula huésped. Un vector en sí denota de este modo una carga para el suministro de una biomolécula en una célula huésped de interés, en la que la biomolécula incluye una molécula de ácido nucleico, que incluye ADN, ARN y ADNc, o, en el caso de un sistema de transfección como vector, una molécula de aminoácido o una combinación de los mismos. Un vector preferido de acuerdo con la presente invención es un plásmido o vector de expresión. Un vector de expresión puede comprender un vector que codifica por lo menos una molécula objetivo, preferentemente una molécula de ácido nucleico, que se introducirá en una célula huésped. Un vector del sistema de vectores asimismo puede comprender más de una molécula objetivo que se introducirá. Alternativamente, el sistema de vectores puede construirse a partir de varios vectores individuales que portan por lo menos una molécula objetivo que se introducirá. Un vector de expresión comprende adicionalmente todos los elementos necesarios para conducir la transcripción y/o traducción de una secuencia de interés en una célula huésped para la que el vector de expresión está diseñado. Estos elementos comprenden, entre otros, elementos reguladores, que están implicados en la regulación de la transcripción, que incluyen promotores y similares funcionales en la célula huésped de interés. Además, un vector de expresión comprende un origen de replicación y, opcionalmente, dependiendo del tipo de vector y el uso previsto de un gen marcador seleccionable, un sitio de clonación múltiple, una etiqueta para unirse a una secuencia de interés, un casete de integración cromosómica y similares. La elección y posible modificación de un vector de expresión adecuado para su uso con una célula huésped respectiva y una secuencia de interés que se insertará en el vector de expresión se encuentra dentro de las capacidades de un experto en la materia.

El término “ADNc” representa un ADN complementario y se refiere a una secuencia/molécula de ácido nucleico obtenida por transcripción inversa a partir de una molécula de ARN. Ya que obtener el ADNc de una secuencia dada y usar adicionalmente este ADNc o clonar dicho ADNc en un vector, preferentemente un vector plasmídico, de interés se trata de un método estándar para el experto en la materia.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “secuencia reguladora” se refiere a una secuencia de ácido nucleico que puede dirigir y/o influir en la transcripción y/o traducción de una secuencia de ácido nucleico objetivo de interés. Por lo tanto, el término se refiere a secuencias promotoras y terminadoras, o a señales de poliadenilación y similares.

Los términos “molécula/secuencia de aminoácidos”, “proteína”, o “péptido” o “polipéptido” se usan indistintamente en la presente memoria sin diferenciar la longitud que comprende una secuencia de aminoácidos específica. Los términos “aminoácido”, “secuencia de aminoácidos” o “molécula de aminoácido” comprenden cualquier proteína, péptido o polipéptido naturales o sintetizados químicamente o una proteína, péptido, polipéptido y enzima modificados, en los que el término “modificado” comprende cualquier modificación recombinante, química o enzimática de la proteína, péptido, polipéptido y enzima, o de la secuencia de ácido nucleico que los codifica.

Los términos “secuencia(s)” y “molécula(s)” se usan indistintamente en la presente memoria cuando se refieren al ácido nucleico o las secuencias/moléculas de aminoácidos.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “farmacéuticamente aceptable” se refiere a aquellos compuestos, materiales, composiciones, y/o formas farmacéuticas que son, dentro del alcance del juicio médico o dentro de la definición de cualquier autoridad médica reguladora, adecuados para el contacto con las células, tejidos o componentes de un sujeto, es decir, seres humanos y animales, incluyendo el contacto con células o tejidos malignos de un sujeto, sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otras complicaciones o efectos secundarios acordes con una relación riesgo-beneficio razonable para un sujeto/paciente.

Como se utiliza en la presente memoria, “sujeto” puede significar un animal humano o no humano. El término incluye, pero no se limita a, mamíferos (por ejemplo, humanos, otros primates, cerdos, roedores (por ejemplo, ratones, ratas o hámsters), conejos, conejillos de Indias, vacas, caballos, gatos, perros, ovejas y cabras). En una forma de realización, el sujeto es un ser humano.

Como se utilizan en la presente memoria, “tratar”, “tratando” y “tratamiento” significan el tratamiento de una enfermedad en un mamífero, por ejemplo, en un humano, que incluye (a) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; (b) aliviar la enfermedad, es decir, provocar la regresión del estado de la enfermedad; y (c) curar la enfermedad. Los términos “prevención” o “prevenir” implican que se proporciona un tratamiento profiláctico antes del inicio de la enfermedad o antes del inicio de los síntomas asociados con una enfermedad que debe prevenirse.

Siempre que la presente divulgación se refiera al porcentaje de la homología o identidad de las secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos, estos valores definen aquellos obtenidos mediante el uso de los ácidos nucleicos del programa EMBOSS Water de alineaciones de secuencia por pares (de nucleótido) ([http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss\\_water/nucleotide.html](http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_water/nucleotide.html)) o el programa EMBOSS Water de alineaciones de secuencia por pares (de proteína) ([http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss\\_water/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_water/)) para secuencias de aminoácidos. Las herramientas proporcionadas por el Instituto Europeo de Bioinformática (“EBI”) del Laboratorio Europeo de Biología Molecular (“EMBL”) para los alineamientos de secuencias locales utilizan un algoritmo Smith-Waterman modificado (ver <http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/> y Smith, T.F. & Waterman, M.S. “Identification of common molecular subsequences” *Journal of Molecular Biology*, 1981 147 (1):195-197). Al realizar una alineación, se utilizan los parámetros predeterminados definidos por el EMBL-EBI. Esos parámetros son (i) para las secuencias de aminoácidos: Matriz = BLOSUM62, penalización por apertura de hueco = 10 y penalización por extensión de hueco = 0.5 o (ii) para secuencias de ácido nucleico: Matriz = DNAfull, penalización por apertura de hueco = 10 y penalización por extensión de hueco = 0.5.

Como se utilizan en la presente memoria, los términos “purificación” o “purificar”, en el contexto de la purificación de material biológico, implican que el material de interés, es decir, partículas de virus infeccioso recombinante y/o VLP y/o RSP se separan de otros componentes, incluyendo cualquier impureza relacionada con el producto o proceso que está presente debido al cultivo en una célula huésped o los aditivos utilizados durante el cultivo celular o la recolección/digestión celular.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “pulido”, en el contexto de un material biológico, implica que un material ya purificado se somete de nuevo a una etapa de purificación adicional, de modo que el material resultante de interés se mejora en vista de su pureza. Desde un punto de vista técnico, los medios para purificar o pulir un material de interés pueden ser iguales o diferentes.

**Descripción detallada**

El objeto de acuerdo con la presente invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Generalmente, se proporciona una composición inmunógena que comprende por lo menos un antígeno recombinante del virus del Zika, en la que por lo menos un antígeno recombinante del virus del Zika está codificado mediante por lo menos una secuencia de ácido nucleico que codifica por lo menos una proteína E del virus del Zika o un fragmento funcional de la misma, en la que por lo menos una secuencia de ácido nucleico que codifica por lo menos un antígeno recombinante del virus del Zika está operativamente ligada a una estructura principal del vector, preferentemente una estructura principal del vector no derivada de flavivirus, comprendiendo la composición inmunógena por lo menos un vehículo y/o excipiente farmacéutica y/o veterinariamente aceptable.

En particular, la composición inmunógena comprende por lo menos un antígeno del virus del Zika seleccionado de la proteína E de un virus del Zika o un fragmento funcional de la misma. Por lo tanto, el antígeno se refiere a un antígeno basado en aminoácidos.

En una forma de realización preferida, no se usa la región de tallo-anclaje para una proteína E o un fragmento funcional de la misma dentro de las secuencias y moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención que codifican los antígenos y, por lo tanto, las composiciones inmunógenas de acuerdo con la presente invención. Al carecer del dominio de tallo-anclaje de anclaje a la membrana, dichos fragmentos funcionales de la proteína E asimismo se denominan proteínas de envoltura solubles o proteínas "sE" en la presente memoria.

La composición inmunógena comprende además por lo menos una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína premembrana (prM) de un virus del Zika o un fragmento de la misma. Como se detalló anteriormente, la proteína prM resultante traducida en una célula huésped o sujeto se procesará adicionalmente antes de su inserción como una proteína M madura en una estructura de envoltura compuesta de proteínas M y E derivadas de un virus del Zika, ya sea en forma de una partícula subviral recombinante (RSP) o en forma de una partícula de virus infecciosa asociada a una estructura principal del vector adecuada, por ejemplo, para una construcción de Zika que comprende una proteína E soluble o un fragmento de la misma, y en la que el fragmento no comprende una región de tallo-anclaje (por ejemplo, SEC ID N°.: 57). La prM funciona como chaperona, ya que ayuda con el plegado correcto de la proteína E de longitud completa. En ciertas formas de realización, se presentan construcciones inmunógenas centrales que comprenden un antígeno derivado de una proteína E soluble, o un fragmento o variante de la misma sin una región de tallo-anclaje.

Por lo tanto, una composición inmunógena o una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención comprenderá una secuencia que codifica o está codificada por una proteína premembrana (prM) de un virus del Zika o un fragmento funcional de la misma, por ejemplo, la porción residual de la proteína prM disponible después de la traducción y procesamiento intracelular, así como una secuencia de señal adecuada para la proteína prM codificada (o moléculas de ácido nucleico) de acuerdo con la presente invención, asimismo denominada como una cuarta secuencia de ácido nucleico en la presente memoria. En la composición inmunógena resultante, la proteína prM estará presente en una forma procesada mediante por lo menos una célula huésped utilizada para la propagación de la construcción recombinante dentro del virus recombinante o RSP resultante, además de una secuencia correspondiente a una proteína E o un fragmento funcional o una variante de la misma, por ejemplo una proteína E truncada sin una región de tallo-anclaje y/o una proteína E que comprende una mutación, por ejemplo, en la posición 107 en comparación con una proteína E de tipo silvestre.

El procesamiento dentro de la célula huésped comprende la escisión de una secuencia de señal prM, por ejemplo, las posiciones de secuencia 105 a 125 de, por ejemplo, SEC ID N°.: 14 o la secuencia correspondiente a la secuencia de señal prM dentro de SEC ID N°.: 15-26 y 88-108.

En otra forma de realización de acuerdo con la presente invención, no se contempla una secuencia adicional que codifique o esté codificada por una proteína premembrana (prM) de un virus del Zika o un fragmento de la misma, así como una secuencia de señal adecuada para la proteína prM codificada.

En ciertas formas de realización, las secuencias de ácido nucleico de acuerdo con los diversos aspectos de la presente invención pueden optimizarse con codones. La optimización de codones implica que el uso de codones de un ADN o ARN se adapta al de una célula u organismo de interés para mejorar las tasas de transcripción, procesamiento y/o estabilidad del ARNm, y/o tasas de traducción, y/o posterior plegamiento de proteínas de dicho ácido nucleico recombinante en la célula u organismo de interés. El experto es muy consciente del hecho de que un ácido nucleico objetivo puede modificarse en una posición debido a la degeneración del codón, mientras que esta modificación conducirá a la misma secuencia de aminoácidos en esa posición después de la traducción, lo cual se logra mediante la optimización de codones para tener en cuenta el uso del codón específico de la especie de una célula u organismo objetivo. La optimización de codones preferida según la presente descripción es la optimización de codones para uso de codones de célula de insectos o célula de mamíferos, particularmente humanos, ya que las secuencias de ácido nucleico derivadas del virus de acuerdo con la presente invención preferentemente se propagarán y/o usarán para células de insectos y mamíferos.

Aunque se caracterizan bien por flavivirus distintos al virus del Zika, la proteína E y otras proteínas estructurales y

no estructurales codificadas por una secuencia de ADN de codificación (CDS) del virus del Zika están mucho menos caracterizadas. La presente divulgación se basa en una extensa comparación *in silico* de los virus del Zika disponibles y CDS virales relacionados para definir, clonar y evaluar las secuencias de codificación del antígeno del virus del Zika adecuadas. Ya que no se dispone de información estructural sobre el virus del Zika, excepto para otros flavivirus, incluyendo el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBEV) o para el virus del Nilo Occidental (WNV), los inventores de la presente invención establecieron secuencias de ácido nucleico y construcciones adecuadas basadas en la analogía con la información disponible de la secuencia y la estructura terciaria disponible para las especies virales relacionadas. Se encontró que las proteínas E del virus del Zika tal como se muestran en SEC ID N°.: 40 a 52 y 130 a 150 presentan un nivel relativamente alto de conservación de secuencia entre sí.

Como se sabía que otras proteínas E de TBEV (ver, por ejemplo, Stiasny et al. o Allison et al., ut supra) son relevantes para el reconocimiento de receptores y la fusión de membranas necesarios para la entrada viral en una célula y que son necesarios para la formación de RSP y albergan epítomos potencialmente relevantes para desencadenar una respuesta inmunitaria (ver, por ejemplo, Stiasny et al. o Allison et al., ut supra), se realizó un análisis comparativo para las CDS del virus del Zika y de Spondweni. Por medio de predicciones *in silico*, se encontró que todas las poliproteínas del virus del Zika (SEC ID N°.: 14 a 26 y 88 a 108) analizadas están altamente conservadas relativamente entre varios serotipos y comprenden una secuencia que representa una proteína prM (posición 126 a 274 de SEC ID N°.: 14 como secuencia de referencia), una secuencia de señal que precede a la proteína prM (posición 105 a 125 de SEC ID N°.: 14 como secuencia de referencia), una secuencia de señal que precede a la proteína E (posición 275 a 290 de SEC ID N°.: 14 como secuencia de referencia) y una proteína E (posición 291 a 794 de SEC ID N°.: 14 como secuencia de referencia). En analogía a Stiasny et al., supra, posiciones 694 a 794 de SEC ID N°.: 14 a 26 y 88 a 108, y SEC ID N°.: 185-191 se identificaron para representar supuestas regiones de tallo-anclaje de o para una proteína E de un virus del Zika, es decir, la región helicoidal proximal a la membrana hipotetizada que impulsa la fusión y aumenta la estabilidad de un trímero de la proteína E de longitud completa. Para el virus del dengue, se descubrió que esta región del tallo resuelta para la estructura de viriones maduros de dengue 2 (Zhang et al., Nat. Struct. Mol. Biol., 2013, 20:105-110) se compone de tres hélices. Para el virus del Zika y de Spondweni, la predicción *in silico* de las regiones del tallo de SEC ID N°.: 14 a 26 y 88 a 108 sugiere que existen dos hélices, la hélice 1 que comprende los residuos 697 a 717 de la poliproteína de acuerdo con cualquiera de SEC ID N°.: 14 a 26 y 88 a 108, y SEC ID N°.: 185-191, y la hélice 2 que comprende los residuos 725 a 745 de la poliproteína de acuerdo con cualquiera de SEC ID N°.: 14 a 26 y 88 a 108.

En particular, las composiciones inmunógenas o moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente divulgación no están restringidas a secuencias de tallo-anclaje homólogas, para las formas de realización, en las que se contempla el uso de una región de tallo-anclaje, pero puede usarse cualquier región de tallo-anclaje heteróloga adecuada, preferentemente una secuencia de tallo-anclaje de otro virus del Zika, o una secuencia de tallo-anclaje de otro virus, preferentemente un flavivirus distinto del virus del Zika. Sobre la base de la divulgación que se proporciona en la presente memoria, mediante la clonación molecular, el experto en la materia puede sustituir fácilmente una región de tallo-anclaje homóloga de una proteína E del virus del Zika, o un fragmento o variante de la misma situada, y el extremo C-terminal de la proteína E natural tal como se detalló anteriormente mediante otra secuencia de tallo-anclaje, por ejemplo, una secuencia de tallo-anclaje de otro virus del Zika, o una secuencia de tallo-anclaje de un virus del dengue, un virus del Nilo Occidental, un virus de la encefalitis por garrapatas, u otro flavivirus. Las regiones de tallo-anclaje heterólogas adecuadas de acuerdo con la presente divulgación pueden derivar de una secuencia de tallo-anclaje del virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (SEC ID N°.: 185), una secuencia de tallo-anclaje del virus del dengue (SEC ID N°.: 186, 187), una secuencia de tallo-anclaje de encefalitis japonesa (SEC ID N°.: 188), una secuencia de tallo-anclaje del virus de la encefalitis de San Luis (SEC ID N°.: 189), una secuencia de tallo-anclaje del virus del Nilo Occidental (SEC ID N°.: 190), o una secuencia de encefalitis del virus de la fiebre amarilla (SEC ID N°.: 191), o una secuencia que presenta por lo menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de SEC ID N°.: 185-191.

Hasta la fecha, existen aproximadamente 70 flavivirus conocidos, 30 de los cuales se han asociado con enfermedades humanas de diversas incidencias y gravedades. Los flavivirus se agruparon originalmente y se tipificaron por su reactividad en análisis serológicos (es decir, neutralización del virus, hemaglutinación y fijación del complemento) de acuerdo con sus determinantes antigénicos únicos (específicos del virus) o compartidos (de reacción cruzada). Estas agrupaciones se confirmaron posteriormente y se ampliaron mediante el mapeo de anticuerpos monoclonales de determinantes epítomícos discretos y el análisis de la secuencia genética de los ARN virales. Podría decirse que los flavivirus de mayor importancia médica en términos de incidencia y gravedad de la enfermedad son los virus transmitidos por artrópodos o Arbovirus, en particular los del Grupo B, que se transmiten por vectores de mosquitos o garrapatas, tal como se detalló anteriormente. Estos incluyen, entre otros, el virus del dengue (DEN), el virus de la fiebre amarilla (VFA), el virus de la encefalitis japonesa (VEJ), el virus del Nilo Occidental (WNV), el virus del Zika (VZ), el virus de la encefalitis de San Luis (VESL), el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBEV) (incluyendo el virus de la encefalitis rusa de primavera-verano (RSSEV)). Debido a la relación taxonómica de los virus anteriores, las secuencias de señal para una proteína E del virus del Zika o un fragmento funcional de la misma, o para una proteína prM, o una región de tallo-anclaje heteróloga C-terminal para una proteína E, asimismo pueden derivar de estos virus, por ejemplo del virus del dengue (secuencia de

referencia del Centro Nacional para la Información Biotecnológica ("NCBI"): NC\_001474.2), el virus del Nilo Occidental (secuencia de referencia del NCBI: NC\_001563.2), el virus de la encefalitis japonesa (secuencia de referencia del NCBI: NC\_001437.1), el virus de la fiebre amarilla (secuencia de referencia del NCBI: NC\_002031.1), el virus de la encefalitis de San Luis (secuencia de referencia del NCBI: NC\_007580.2) o el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (secuencia de referencia del NCBI: NC\_001672.1) o de otro flavivirus, otro virus o, con respecto a las secuencias de señal, de una secuencia de señal de célula huésped, estando asimismo disponibles las últimas secuencias de señal para los expertos como parte de los vectores comercialmente disponibles. De este modo, las secuencias adecuadas se pueden definir sobre la base de la divulgación y las secuencias proporcionadas en la presente memoria por medio de alineamientos de secuencia para identificar secuencias que presentan un cierto rango de homología, y/o por medio de búsquedas específicas dentro de bases de datos de péptidos señal y similares.

Para lograr un tráfico y/o procesamiento *in vivo* óptimo de la proteína E y, opcionalmente, la proteína prM, tanto la secuencia que codifica la proteína E o un fragmento de la misma como la secuencia que codifica la proteína prM o un fragmento de la misma pueden estar precedidos por una secuencia de señal adecuada que codifica un péptido señal que permite la translocación de la proteína. La expresión del gen flaviviral comienza a partir de un ARNm policistrónico que produce una poliproteína correspondiente, que atraviesa las membranas del retículo endoplásmico (RE) múltiples veces y se escinde proteolíticamente en las diferentes proteínas virales. En ciertas formas de realización, se puede usar una secuencia de señal derivada del virus del Zika, tal como se detalla anteriormente para SEC ID N°.: 14 a 26 y 88 a 108. En otra forma de realización, una secuencia de señal que codifica un péptido señal correspondiente puede posicionarse antes de la secuencia que codifica la proteína E, la proteína prM o un fragmento de las mismas, mientras que esta secuencia heteróloga puede derivar de otro flavivirus o de cualquier otra especie. Por ejemplo, podría ser adecuado usar una secuencia de señalización específica de una célula de insecto para lograr un ensamblaje de antígeno funcional, cuando las secuencias de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención se producen en una célula de insecto. Del mismo modo, pueden usarse secuencias de señal humanas o humanizadas con la autorización correspondiente para la producción de vacunas para la secuencia respectiva. Cualquier secuencia de señal puede colocarse en la región inmediatamente anterior a la región que codifica una proteína antigénica de interés, preferentemente la secuencia de señal que precede a la proteína prM se colocará en la posición 105 a 125 de SEC ID N°.: 14 como secuencia de referencia, y una secuencia señal que precede a la proteína E se colocará en la posición 275 a 290 de SEC ID N°.: 14 como secuencia de referencia. De este modo, un experto en la materia puede definir fácilmente secuencias de señal adecuadas que codifican péptidos señal adecuados, los cuales pueden usarse de acuerdo con la presente divulgación en la posición correcta, ya sea frente a la región de codificación de una proteína E o un fragmento funcional de la misma, y/o frente a la región de codificación de una proteína prM o un fragmento funcional de la misma de un virus del Zika dentro de una molécula de ácido nucleico de interés.

Como se utiliza en la presente memoria, el término antígeno del virus del Zika se refiere a un antígeno, tal como se definió anteriormente, en el que la secuencia de ácido nucleico que codifica el antígeno deriva de la CDS de un virus del Zika o un virus relacionado con un virus del Zika. Tal virus relacionado con un virus del Zika es el virus de Spondweni. El virus de Spondweni es un arbovirus, o virus transmitido por artrópodos, que asimismo es miembro de la familia *Flaviviridae* y del género *Flavivirus*. Al igual que el virus del Zika, es transmitido por mosquitos. Al comparar la secuencia de CDS de un virus de Spondweni, ver, por ejemplo, SEC ID N°.: 107 o 108, se descubrió que la proteína E codificada por SEC ID N°.: 107 presenta un 74.0% de identidad y un 86.4% de similitud (el alineamiento Emboss Needle mencionado anteriormente) con la secuencia de acuerdo con SEC ID N°.: 40 (proteína E y región de tallo-anclaje de la cepa BeH818995 del virus del Zika), incluyendo ciertos motivos estructurales altamente conservados, tales como los conocidos para otros virus del Zika (ver Allison et al. supra). Un fragmento de una proteína E y asimismo de una proteína prM de acuerdo con la presente invención es, por lo tanto, por lo menos una secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos contigua de la proteína E y/o la proteína prM, en la que la proteína E comprende desde la posición 291 a 794 de cualquiera de SEC ID N°.: 14 a 26 y 88 a 108, y la proteína prM comprende desde la posición 126 a 274 de cualquiera de SEC ID N°.: 14 a 26 y 88 a 108, o está representada por cualquiera de SEC ID N°.: 185-191.

Tal como se detalló anteriormente, los flavivirus y, asimismo, el virus del Zika codifican siete proteínas no estructurales, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5. De acuerdo con la presente invención, la composición inmunógena no comprende ninguna proteína no estructural del virus del Zika como antígeno, ya que las secuencias de aminoácidos que comprenden dichas proteínas no estructurales generalmente contribuyen a la morfogénesis del virus a medida que forman el complejo de replicasa o los cofactores del mismo (ver Murray et al., Nat. Rev. Microbiol., 2008, 6(9):699-708). Sin embargo, en el contexto de la presente invención, dichas funciones no son necesarias, ya que una composición inmunógena de acuerdo con la presente invención debe estar libre del virus del Zika, proteínas derivadas del flavivirus, o genes implicados en la replicación viral, como se usa a menudo para los flavivirus quiméricos (ver EP 1 401 859 B1). En ciertas formas de realización, sin embargo, podría preverse utilizar una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de la cápside (C) derivada del virus del Zika en combinación con una secuencia de ácido nucleico que codifica NS2B y/o NS3 derivada del virus del Zika. De acuerdo con esta forma de realización, se proporcionan tanto la secuencia que codifica C o un fragmento funcional de la misma, y la secuencia que codifica NS2B y/o NS3 o un fragmento catalíticamente activo de la misma, aunque la función de la secuencia de NS2B y/o NS3 conducirá a una escisión de la proteína C de modo que los antígenos



derivados del virus del Zika resultantes no comprendan una secuencia de antígeno derivada de la proteína C.

La estructura principal del vector es una estructura principal del vector distinta de la estructura principal del vector de flavivirus como molécula transportadora, es decir, la composición inmunógena puede obtenerse de una molécula química de ácido nucleico, mientras que la estructura principal del vector no está asociada, es decir, no comprende, o secuencias flavivirales o virales del Zika de origen natural. Esta estrategia que usa una combinación de cruce entre géneros o, preferentemente, incluso una combinación de cruce entre especies de una estructura principal viral y una inserción que libera antígeno es adecuada y versátil para obtener una composición inmunógena que presente un epítipo viral bien definido y caracterizado, así como una molécula portadora, preferentemente una molécula de estructura principal del vector que es segura en su uso con respecto a aplicaciones médicas. La estructura principal del vector de acuerdo con la presente invención está ligada operativamente, es decir, ligada covalentemente a por lo menos una secuencia de ácido nucleico de interés. Un experto conocerá los métodos adecuados para clonar una secuencia de interés de ácido nucleico en una estructura principal del vector de interés, mientras que la clonación puede realizarse enzimáticamente, por ejemplo, mediante ligadura, o mediante métodos de clonación sin enzimas conocidos en el campo de la biología. Las partículas virales infecciosas resultantes de acuerdo con la presente invención, por lo menos en ciertas formas de realización, pueden comprender tanto secuencias/moléculas de un virus del Zika como secuencias/moléculas que se originan a partir de una estructura principal del vector y opcionalmente moléculas que se originan a partir de una célula huésped utilizada para la producción de las partículas de virus infecciosas, en las que las partículas comprenden opcionalmente RSP.

En una forma de realización de acuerdo con el primer aspecto, se proporciona una composición inmunógena, (a) en la que por lo menos una secuencia de ácido nucleico no comprende una secuencia que codifica una región de tallo-anclaje de una proteína E del virus del Zika, o una región de tallo-anclaje heteróloga para una proteína E de un virus del Zika; o (b) en la que la por lo menos una secuencia de ácido nucleico codifica por lo menos una proteína E de un virus del Zika o un fragmento funcional de la misma que presenta una mutación en la posición de aminoácido 107 en comparación con la secuencia de SEC ID N°.: 40 a 52 o 130 a 150 que representan proteínas E de tipo silvestre de un virus del Zika, y, opcionalmente, en la que por lo menos una secuencia de ácido nucleico comprende por lo menos una secuencia que codifica una región de tallo-anclaje de una proteína E de un virus del Zika, o una región de tallo-anclaje heteróloga para una proteína E de un virus Zika; y/o (c) en la que la por lo menos una secuencia de ácido nucleico codifica por lo menos una proteína E de un virus del Zika o un fragmento funcional de la misma que presenta una mutación L107D en comparación con la secuencia de SEC ID N°.: 40 a 52 o 130 a 150, y/o (d) en la que la por lo menos una secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia adicional que codifica una proteína de membrana de un virus del Zika o un fragmento funcional de la misma; y/o (e) preferentemente en la que la por lo menos una secuencia de ácido nucleico no comprende una secuencia de ácido nucleico adicional que codifica una proteína no estructural de un flavivirus.

Para la mutación L107D se encontró, en el contexto de construcciones de RSP, por ejemplo, comprendidas por SEC ID N°.: 58, que esta mutación suprime la fusión de RSP con la membrana celular de una célula objetivo, y la mutación simultáneamente no muestra ningún efecto sobre la formación de partículas subvirales.

Para diversas formas de realización de acuerdo con la presente invención, se descubrió que una mutación en la posición 107 codifica una proteína que comprende un antígeno del virus del Zika, en la que el antígeno aún puede presentarse en una célula huésped y en la que la proteína mantiene su capacidad para expresarse y secretarse, pero la mutación en la posición 107, tal como se observó para la proteína E de TBEV, presentaba una función atenuante en comparación con la proteína E de tipo silvestre, que es favorable para cualquier estrategia de vacunación. Se llevaron a cabo mutaciones adicionales en la posición 107 de una proteína E derivada del virus del Zika. La posición mutó sistemáticamente de leucina a un aminoácido con carga positiva (arginina (R), histidina (H), lisina (K)) o negativa (ácido aspártico (D), ácido glutámico (E)). Además, la leucina en la posición 107 se intercambió a prolina (P) o a una cadena lateral aromática, que incluía fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W), o a un aminoácido polar no cargado, específicamente, serina (S), treonina (T), asparaginas (N) y glutamina (Q). Todas, salvo la mutación de prolina, que presumiblemente alteró la conformación del bucle CD, tal como se describió para la proteína TBEV anterior, (ver Allison et al.) y, por lo tanto, el complejo ternario de la proteína E en asociación con otras proteínas o lípidos, resultaron ser adecuadas y, por lo tanto, se incluyeron para el diseño de la vacuna, y las variantes L107D, L107E, L107N y L107Q, y los mutantes aromáticos, es decir, L107F, L107Y y L107W, representan los candidatos preferidos.

En un aspecto preferido, el antígeno de la proteína E del virus del Zika o el fragmento funcional del mismo no codifica una región de tallo-anclaje, es decir, ninguna región de tallo-anclaje homóloga o heteróloga está codificada por las secuencias de ácido nucleico relevantes. Esto permite la producción de un ectodominio de proteína E soluble (sE) restringido a epítopos expuestos a la superficie que son de interés destacado para generar una respuesta inmunitaria protectora contra un virus del Zika, en la que los residuos de la proteína E expuestos a la superficie son la fuente más importante de epítopos para iniciar una respuesta inmunitaria contra los flavivirus. Además, dicho antígeno sE nuclear proporcionó una respuesta inmunitaria sólida, tal como se detalla a continuación, sin introducir más de lo necesario en una vacuna protectora contra el Zika. Además, de acuerdo con esta forma de realización, estas variantes no comprenden secuencias adicionales que codifiquen proteínas no

estructurales de un virus del Zika u otro flavivirus por las razones detalladas anteriormente. Las secuencias correspondientes se muestran, entre otras, en SEC ID N°.: 53, 55 y 57, y pueden derivar de cualquiera de SEC ID N°.: 1-13, 67-87, 14-26, 88-108, 27-39, 109-129, 40-52 o 130-150.

- 5 De acuerdo con la presente invención, las composiciones inmunógenas que comprenden una de las mutaciones L107 anteriores en la proteína E o la secuencia que las codifica pueden comprender adicionalmente una secuencia de tallo-anclaje en una forma de realización, o pueden carecer de una secuencia adicional de tallo-anclaje en otra forma de realización.
- 10 En una forma de realización adicional de acuerdo con los diversos aspectos de la presente invención, la mutación atenuante L107D se incorpora en la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína E derivada del virus del Zika o un fragmento de la misma, que es de especial importancia para una proteína E que comprende una región de tallo-anclaje. Las secuencias correspondientes se muestran, entre otras, en SEC ID N°.: 54, 56 y 58, y pueden derivar de cualquiera de SEC ID N°.: 1-13, 67-87, 14-26, 88-108, 27-39, 109-129, 40-52 o 130-150.
- 15 De acuerdo con la presente invención, como asimismo se detalló anteriormente, la por lo menos una secuencia de ácido nucleico que codifica por lo menos un antígeno del virus del Zika recombinante de una proteína E de un virus del Zika o un fragmento funcional de la misma comprenderá además una secuencia adicional que codifica una proteína de membrana de un virus del Zika o un fragmento funcional de la misma.
- 20 Preferentemente, las moléculas de ácido nucleico, las secuencias de ácido nucleico y las composiciones inmunógenas de acuerdo con la presente invención no comprenderán una secuencia de ácido nucleico adicional que codifique una proteína no estructural de un flavivirus distinto de una proteína E o un fragmento de la misma de un virus del Zika y, opcionalmente, una proteína (pr)M o un fragmento funcional de la misma de un virus del Zika.
- 25 En ciertas formas de realización, las secuencias que codifican una proteína de cápside (C) o un fragmento funcional de la misma de un virus del Zika se pueden incluir en las moléculas de ácido nucleico, las secuencias de ácido nucleico y las composiciones inmunógenas de acuerdo con la presente invención.
- 30 En otra forma de realización de acuerdo con el primer aspecto, la estructura principal del vector se selecciona de entre el grupo que consiste en un andamiaje derivado del virus del sarampión, un andamiaje derivado de lentivirus o un andamiaje derivado de Ankara modificado con vaccinia y, por lo tanto, una estructura principal del vector no derivada de flavivirus por las razones detalladas anteriormente.
- 35 Preferentemente, la estructura principal del vector es una estructura principal del vector atenuada, por ejemplo, una estructura principal del vector recombinantemente modificada que da como resultado una forma de virus atenuado, en la que la forma de virus resultante ya no causa síntomas clínicos, como lo hace el virus de tipo silvestre correspondiente, de modo que la estructura principal del vector en sí puede considerarse segura para las estrategias de vacunación.
- 40 Todavía en una forma de realización adicional de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, la estructura principal del vector deriva de una cepa viral del virus del sarampión atenuado, y la cepa del virus del sarampión preferentemente se selecciona de entre el grupo que consiste en la cepa Schwarz, la cepa Zagreb, la cepa AIK-C y la cepa Moraten.
- 45 De acuerdo con todos los aspectos y formas de realización de la presente divulgación, una cepa viral del virus del sarampión atenuado se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende todas las partes de la región antígenica de un virus del sarampión, que incluye preferentemente mejoras recombinantes adicionales. En SEC ID N°.: 59 y 60 y 192 se divulga una estructura principal del vector del virus del sarampión adecuado.
- 50 De acuerdo con una forma de realización de los diversos aspectos de la presente divulgación, la secuencia de ácido nucleico que codifica por lo menos un antígeno del virus del Zika puede ser una partícula de virus infecciosa y recombinante que comprende un andamiaje o estructura vertebral del virus del sarampión (MV) infeccioso, preferentemente basado en la cepa Schwarz del virus del sarampión, que se conoce desde hace mucho tiempo y se ha aprobado como vacuna recombinante. A fin de ser adecuada en el contexto de la presente invención, la estructura principal del vector del MV comprende las siguientes unidades de transcripción génica que comprenden desde 5' a 3': (a) un polinucleótido que codifica la proteína N de un MV, (b) un polinucleótido que codifica la proteína P de un MV, (c) el polinucleótido que codifica por lo menos una proteína estructural usada como antígeno de Zika, (d) un polinucleótido que codifica la proteína M de un MV, (e) un polinucleótido que codifica la proteína F de un MV, (f) un polinucleótido que codifica la proteína H de un MV, y (g) un polinucleótido que codifica la proteína L de un MV, y dichos polinucleótidos y la construcción de ácido nucleico están operativamente ligados y bajo el control de las secuencias de replicación viral y reguladoras de la transcripción, tales como las secuencias líder y remolque de MV. Las expresiones "proteína N", "proteína P", "proteína M", "proteína F", "proteína H" y "proteína L" se refieren respectivamente a la nucleoproteína (N), la fosfoproteína (P), la proteína de la matriz (M), la proteína de fusión (F), la proteína de hemaglutinina (H) y la proteína grande de ARN polimerasa (L) de un virus del sarampión. Estos componentes se han identificado en la técnica anterior y se describen especialmente en Fields, Virology (Knipe & Howley, 2001). La hemaglutinina (H) y la proteína de fusión (F) son componentes de la envoltura viral que son
- 65

responsables de mediar la fusión con las células huésped. H se une a CD46 y CD150 en la superficie de una célula huésped. En especial, H es altamente inmunógena en la célula u organismo huésped y durante una infección natural es responsable de la inmunidad permanente que sigue a dicha infección. Dicha inmunidad se debe al establecimiento de la memoria mediada por células y a la producción de anticuerpos neutralizantes contra la proteína H. Durante el ciclo de replicación, la síntesis del virus del sarampión o del ARNm de andamiaje del virus del sarampión, la traducción y la replicación tienen lugar en el citoplasma de una célula huésped. Por lo tanto, la expresión "operativamente ligado" se refiere al enlace funcional existente entre por lo menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno de acuerdo con los métodos de la invención, de manera que dicha secuencia de ácido nucleico dentro del andamiaje del virus del sarampión se transcribe y traduce de manera eficiente, en particular en células o líneas celulares, especialmente en células o líneas celulares usadas como bancos de células de acuerdo con la presente invención, de modo que se puede presentar un epítipo antigénico después. Un experto en la materia presenta la capacidad de clonar un ácido nucleico de interés en un andamiaje del virus del sarampión tal como se describe en la presente memoria. De este modo, las partículas del virus quimérico que pueden obtenerse de acuerdo con la presente invención proporcionan sinérgicamente una respuesta inmunitaria específica contra por lo menos un epítipo derivado de una proteína E del virus del Zika junto con las propiedades adicionales detalladas anteriormente asociadas con una cadena principal del vector del MV.

Una molécula particular de ácido nucleico de ADNc adecuada para su uso en las formas de realización de acuerdo con todos los aspectos de la presente invención es la que se obtiene usando la cepa Schwarz del virus del sarampión. Por lo tanto, el ADNc usado dentro de la presente invención se puede obtener tal como se describe en el documento WO 2004/000876 A1. La secuencia de este plásmido sin ATU se describe en la presente memoria como SEC ID N°: 59. Se ha obtenido un plásmido pTM-MV Schw correspondiente a partir de un plásmido Bluescript y comprende el polinucleótido que codifica la cadena de ARN del virus del sarampión (+) de longitud completa de la cepa Schwarz colocada bajo el control del promotor de la ARN polimerasa T7. A continuación, SEC ID N°: 60 y 192 describen el andamiaje del virus del sarampión que incluye una ATU2, siendo ambas secuencias idénticas y únicamente difieren en la longitud de la estructura principal de pBluescript restante. Además, comprende un sitio de enzima de restricción NotI (del vector de clonación, pBluescript), una secuencia del promotor T7 y del terminador T7, 5': ribozima de cabeza de martillo; 3': secuencia de ribozimas de hepatitis delta, una secuencia derivada del virus del sarampión, un promotor/terminador del sarampión, y sitios de restricción *Bsi*MI y *Bss*HII únicos para la clonación de las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. SEC ID N°: 153 describe un andamiaje adicional del virus del sarampión basado en la cepa Schwarz e incluye una inserción clonada dentro de un sitio ATU3. De acuerdo con la presente invención, una molécula de ácido nucleico de ADNc adecuada para su uso de acuerdo con la presente invención comprende por lo menos un antígeno, que deriva de un virus del Zika. La secuencia de acuerdo con SEC ID N°: 59, 60 o 192, que representa un ADNc de MV infeccioso correspondiente al antigenoma de la cepa de vacuna de MV de Schwarz, se ha descrito en otra parte (Combredet, C, et al., A molecularly cloned Schwarz strain of measles virus vaccine induces strong immune responses in macaques and transgenic mice. *J Virol*, 2003. 77(21): 1546-54). Por ejemplo, la codificación de ADNc para los antígenos estructurales del virus del Zika se puede generar mediante síntesis química (GenScript, EE.UU.) o mediante técnicas de clonación recombinante disponibles para el experto en la materia sobre la base de la presente divulgación. La secuencia completa, es decir, la estructura principal del vector más la inserción que codifica el antígeno del virus del Zika, debe respetar la "regla de seis", que estipula que el número de nucleótidos en el genoma del MV debe ser un múltiplo de 6 y contiene el sitio de restricción *Bsi*MI en el extremo 5' (posición 3539-3544 de SEC ID N°: 60, 3526-3531 de SEC ID N°: 192), y *Bss*HII en el extremo 3' (posición 3545 a 3550 de SEC ID N°: 60; posición 3532 a 3537 de SEC ID N°: 192), como es evidente desde las posiciones 3539 a 3550 de SEC ID N°: 60 o las posiciones 3526 a 3537 de SEC ID N°: 192. La secuencia se optimizó con codones para la expresión del virus del sarampión en células de mamíferos. Este ADNc se insertó en pTi-MV Schw-ATU2 digerido con *Bsi*MI y *Bss*HII, que contiene una unidad de transcripción adicional (ATU) entre los genes de la fosfoproteína (P) y la matriz (M) del genoma del MV de Schwarz (Combredet, C, et al., A molecularly cloned Schwarz strain of measles virus vaccine induces strong immune responses in macaques and transgenic mice. *J Virol*, 2003. 77(21): 1546-54). Las secuencias de ácido nucleico representativas están representadas en SEC ID N°: 57 (sE del MV del Zika) y SEC ID N°: 58 (RSP del MV del Zika). El rescate de una partícula de virus infecciosa y recombinante derivada de un andamiaje del virus del sarampión se puede realizar tal como se describió previamente usando un sistema de rescate previamente descrito (Radecke, F., et al., Rescue of measles viruses from cloned DNA. *EMBO J*, 1995. 14(23): p. 5773-84; WO 2008/078198 A2). Los títulos virales se pueden determinar mediante un análisis de dilución del límite de punto final, por ejemplo, en células Vero, y TCID<sub>50</sub> se puede calcular utilizando el método de Kärber conocido por los expertos en la materia.

Un experto en la materia con la información de la presente divulgación puede determinar fácilmente los sitios de restricción únicos presentes en SEC ID N°: 60 o 192 con el fin de clonar, es decir, crear un enlace operativo, entre el virus del sarampión infeccioso recombinante como la estructura principal del vector y una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno de un virus del Zika operativamente ligado a dicho andamiaje o estructura principal del vector del virus del sarampión. Un experto en la materia puede definir una estrategia de clonación adecuada para introducir una secuencia de ácido nucleico de interés en un andamiaje del virus del sarampión en diferentes posiciones para permitir una inserción funcional. Por lo tanto, una inserción funcional o el término operativamente ligado en este contexto pretende significar una introducción, que permitirá la transcripción y traducción de todas las secuencias de aminoácidos codificadas por el andamiaje del virus del sarampión, es decir,

la inserción no puede interrumpir una secuencia reguladora, incluyendo un promotor y similares, o una secuencia de codificación de aminoácidos, incluyendo las proteínas estructural y funcionalmente relevantes del virus del sarampión, es decir, la "proteína N", "proteína P", "proteína M", "proteína F", "proteína H" y "proteína L", o la secuencia del antígeno introducida en el andamiaje o la estructura principal del virus del sarampión.

5

La presente divulgación no se limita al uso de una estructura principal del vector flaviviral. Como se detalla a continuación (ver el Ejemplo 15), otras estructuras principales de vectores adecuadas, por ejemplo, una estructura principal del vector lentiviral, preferentemente estructuras principales de vectores aprobados para propósitos de vacunación, puede usarse como moléculas portadoras para los antígenos del virus del Zika, tal como se describe en la presente memoria, para obtener una composición inmunógena.

10

La estructura principal del vector del virus del sarampión o cualquier otra estructura principal no derivada del flavivirus de acuerdo con la presente divulgación, desde un punto de vista estructural, siempre representará la mayoría del material que se debe transcribir/traducir en una partícula de virus infecciosa y recombinante. Por lo tanto, asimismo influirá predominantemente en las características funcionales y biológicas de la envoltura de las partículas de virus infecciosas purificadas y, en formas de realización que permitan la preparación de partículas similares a virus (VLP) o partículas subvirales recombinantes (RSP) en el momento de la replicación del andamiaje del virus del sarampión que comprende por lo menos una secuencia de ácido nucleico que codifica por lo menos un polipéptido, en la que el polipéptido es por lo menos un antígeno derivado de virus del Zika, los métodos divulgados en la presente memoria permiten la copurificación de viriones derivados del andamiaje del virus del sarampión y las VLP/RSP.

15

20

Todavía en otra forma de realización de acuerdo con el primer aspecto de la presente divulgación, la composición inmunógena comprende por lo menos una secuencia de ácido nucleico o por lo menos una secuencia de aminoácido codificada mediante por lo menos una secuencia de ácido nucleico, en la que por lo menos una secuencia de ácido nucleico o por lo menos una secuencia de aminoácidos se selecciona de entre el grupo que consiste en SEC ID N°.: 27 a 39, 53 a 58, 61 a 66, 109 a 139, 151 y 152 o una secuencia que presenta por lo menos 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%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología de secuencia con éstas, siempre que la secuencia homóloga, opcionalmente después de la expresión, codifique todavía por lo menos un antígeno funcional del virus del Zika.

25

30

El término antígeno "del virus del Zika funcional" en este contexto significa una secuencia de aminoácidos contigua a la traducida a partir de la secuencia de ácido nucleico correspondiente, que comprende por lo menos un antígeno derivado de la proteína E y, opcionalmente, asimismo la proteína prM, que puede someterse a un posterior procesamiento y modificación postraduccional durante la producción en una célula huésped o sujeto, y posteriormente se plegará adecuadamente en la forma de una partícula de virus y/o una partícula subviral recombinante, de modo que las secuencias de la proteína E y, opcionalmente, asimismo la proteína prM, se presenten en la superficie de la partícula respectiva y, por lo tanto, estén disponibles para la interacción con las moléculas de una célula huésped que se infectará/vacunará.

35

40

Las proteínas E del virus del Zika forman parte de la superficie viral y se descubrió que los anticuerpos neutralizantes se elevaron predominantemente contra la proteína E parte de la poliproteína del virus del Zika, concretamente su ectodominio o fracción E soluble (sE) que corresponde a las secuencias de aminoácidos 291 a 693 de SEC ID N°.: 14 a 26 y 88 a 108. Además, podría lograrse una respuesta inmunitaria protectora utilizando por lo menos un fragmento contiguo de la proteína sE derivada de SEC ID N°.: 14, es decir, SEC ID N°.: 63 y 64 en una configuración experimental (ver a continuación). Se descubrió que la proteína prM del virus del Zika de acuerdo con SEC ID N°.: 1 y 14 presenta una actividad de chaperona útil con respecto a la proteína E o un fragmento de la misma, mientras que el impacto antigénico se logró principalmente mediante la porción de la proteína E. Por lo tanto, en ciertas formas de realización, la inclusión de una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína prM derivada del virus del Zika, y, opcionalmente, que asimismo incluye una secuencia que codifica el péptido señal adecuada, podría ser favorable, aunque no necesaria, para provocar una respuesta inmunitaria protectora contra el virus del Zika. La inclusión de una secuencia que codifica la proteína prM y una secuencia que codifica la proteína E, o los fragmentos respectivos de diferentes serotipos del virus del Zika puede ser favorable para lograr un amplio alcance de protección contra varios serotipos del virus del Zika.

45

50

55

La poliproteína del virus del Zika de varios serotipos generalmente comprende la secuencia arginina-arginina, o "RR", en las posiciones 103 y 104 de la poliproteína de acuerdo con SEC ID N°.:14 a 26 y 88 a 108. Se descubrió que estos aminoácidos con carga positiva inmediatamente antes de la secuencia de señal de prM nativa en la posición 105 a 125 de la poliproteína respectiva pueden ayudar a optimizar la localización de la secuencia que comprende el antígeno derivado del virus del Zika en la membrana y, por lo tanto, el ensamblaje apropiado de las proteínas estructurales resultantes. Por lo tanto, en ciertas formas de realización de acuerdo con la presente invención, por lo menos una secuencia de ácido nucleico que codifica por lo menos un antígeno del virus del Zika comprenderá una secuencia que codifica este motivo RR tal como se dilucida en SEC ID N°.: 53 a 58. En otras formas de realización, el motivo RR puede omitirse tal como se muestra en SEC ID N°.: 151 y 152.

60

65

En un segundo aspecto de acuerdo con la presente invención, se proporciona una molécula de ácido nucleico, o una molécula de aminoácido codificada por la molécula de ácido nucleico, en la que la molécula de ácido nucleico comprende por lo menos una secuencia de ácido nucleico, por lo menos una secuencia de ácido nucleico que comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica por lo menos una proteína E de un virus del Zika o un fragmento funcional de la misma, y una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica por lo menos una secuencia de señal de proteína E para una proteína E del virus del Zika o para un fragmento funcional de la misma, y opcionalmente comprende una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica por lo menos una proteína premembrana de un virus del Zika o un fragmento funcional de la misma y que opcionalmente comprende una cuarta secuencia de ácido nucleico que codifica por lo menos una secuencia de señal de proteína premembrana para una proteína premembrana del virus del Zika o para un fragmento funcional de la misma, en la que la primera y opcionalmente la segunda y/o la tercera y/o la cuarta secuencia de ácido nucleico deriva(n) independientemente de SEC ID N°.: 1 a 13 y 67 a 87, preferentemente en la que la molécula de ácido nucleico no comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína C de un flavivirus, y/o preferentemente en la que la molécula de ácido nucleico no comprende una secuencia de ácido nucleico adicional que codifica una proteína no estructural de un flavivirus, (a) en la que la molécula de ácido nucleico comprende adicionalmente una mutación dentro de la primera secuencia de ácido nucleico en la posición que codifica la posición de aminoácido L107 de la proteína E de un virus del Zika o el fragmento funcional de la misma en comparación con la secuencia de SEC ID N°.: 27 a 39, 40 a 52, 109 a 129 o 130 a 150, y opcionalmente en la que por lo menos una primera secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia que codifica la región de tallo-anclaje de la proteína E de un Zika del virus derivado independientemente de SEC ID N°.: 1 a 13 y 67 a 87, o en donde la proteína E de un virus del Zika comprende una región de tallo-anclaje heteróloga seleccionada de entre cualquiera de SEC ID N°.: 185 a 191, o una secuencia que presenta por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología de secuencia, o (b) en la que la molécula de ácido nucleico no comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una región de tallo-anclaje de la proteína E de un virus del Zika o una región de tallo-anclaje heteróloga para una proteína E del virus del Zika.

Los efectos favorables de una mutación L107 se describieron anteriormente.

En otra forma de realización preferida, no se usa la región de tallo-anclaje para una proteína E o un fragmento funcional de la misma dentro de las secuencias y moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención que codifican los antígenos y, por lo tanto, las composiciones inmunógenas de acuerdo con la presente invención. Al carecer del dominio de tallo-anclaje de anclaje a la membrana, dichos fragmentos funcionales de la proteína E asimismo se denominan proteínas de envoltura solubles o proteínas "sE" en la presente memoria.

En otra forma de realización de acuerdo con los diversos aspectos de la presente invención, se usa una secuencia de tallo-anclaje heteróloga, es decir, una secuencia de tallo-anclaje de un organismo/virus distinto de un virus del Zika para las moléculas de ácido nucleico o las composiciones inmunógenas de acuerdo con la presente invención.

La molécula de ácido nucleico de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención comprende preferentemente una secuencia que codifica una secuencia de señal o un péptido señal antes de la proteína E o un fragmento de la misma, o antes de la proteína prM o un fragmento de la misma, para permitir el tráfico y la localización adecuados de la proteína o fragmento adecuado como antígeno del virus del Zika. En este contexto, "antes" implica en una dirección 5' en relación con una secuencia de ADN, o en la posición N-terminal con respecto a una proteína.

De acuerdo con todas las formas de realización de la presente invención, una secuencia de ácido nucleico, asimismo denominada segunda secuencia nucleica en la presente memoria, se usará para la producción de las composiciones inmunógenas o estará presente para que las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención proporcionen un direccionamiento adecuado de la proteína E de un virus del Zika o el fragmento del mismo después de la traducción dentro de por lo menos una célula huésped. Dicha secuencia de señal de proteína E comprende, por ejemplo, las posiciones de secuencia 275 a 290 de SEC ID N°.: 14 o las posiciones correspondientes dentro de SEC ID N°.: 15-26 y 88-108, o las secuencias pueden comprender secuencias de señal heterólogas, o secuencias de señal modificadas y optimizadas específicamente para una célula huésped de interés, y dicha célula huésped transcribirá, traducirá y procesará finalmente las moléculas de ácido nucleico y las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de acuerdo con la presente invención para producir las composiciones inmunógenas de acuerdo con la presente invención.

En particular, las composiciones inmunógenas o moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente divulgación no están restringidas a secuencias de señal de proteína prM o E "homólogas", es decir, una secuencia derivada del mismo organismo/virus, sino cualquier secuencia de señal "heteróloga" adecuada, es decir, se puede usar una secuencia derivada de otro organismo/virus, preferentemente una secuencia de señal de otro virus del Zika, o una secuencia de señal de otro virus, preferentemente un flavivirus distinto del virus del Zika, o una secuencia de señal derivada de una célula huésped.

Como se utilizan en la presente memoria, una "secuencia de señal" o "péptido señal" se refiere a una secuencia usualmente ubicada en el extremo N-terminal de una preproteína. En este contexto, la secuencia asimismo se

puede llamar "secuencia/péptido líder". Para ciertas proteínas transmembrana, la secuencia señal asimismo puede ser uno de los dominios transmembrana ("secuencia de señal-anclaje"). El péptido señal después de la traducción es usualmente un péptido corto de aproximadamente 15 a 30 aminoácidos que es necesario para dirigir la proteína (naciente) hacia un orgánulo o una ubicación dentro de una célula, o hacia la vía secretora. Esta orientación es necesaria durante el desarrollo de un virus o partícula de virus para lograr un tráfico apropiado dentro de una célula. Los péptidos señal correspondientes no estarán necesariamente presentes en las composiciones inmunógenas de acuerdo con la presente invención, ya que las secuencias de/péptidos señal se escinden o se escinden parcialmente durante el procesamiento viral o de RSP dentro de una célula.

El procesamiento de poliproteínas es importante en la regulación de la expresión génica de muchos virus de ARN de cadena positiva, incluyendo los flavivirus de ARN de cadena positiva encapsulados y, particularmente, el virus del Zika. La producción a partir de una poliproteína de proteínas precursoras y maduras (ver la figura 1 para el virus del Zika), que puede presentar diferentes actividades funcionales, puede modularse cuantitativa y temporalmente. Esto implica predominantemente la alteración de las especificidades de escisión de las proteasas citoplásmicas codificadas por virus presentes en los virus nativos. La regulación de una escisión de peptidasa señal en la luz del retículo endoplásmico (RE) por una proteasa citoplásmica viral se ha descrito para el procesamiento de la región de poliproteína estructural de varios flavivirus. Lo anterior es interesante, ya que generalmente se supone que las escisiones de peptidasas señal tienen lugar rápidamente durante la translocación de proteínas a través de la membrana del RE (Stocks & Lobigs, J. of Virol., 1998, vol. 72, no.3, pp. 2141-2149).

Las moléculas de ácido nucleico que codifican por lo menos una proteína E de un virus del Zika o un fragmento funcional de las mismas y, preferentemente, que asimismo codifican una proteína prM o un fragmento funcional de las mismas de acuerdo con la presente invención, irán precedidas, en una dirección 5' en el nivel de ADN y el extremo N-terminal para la proteína correspondiente, por una secuencia de señal adecuada. La secuencia de señal no está restringida a la secuencia de señal endógena de un virus del Zika dado usado para una construcción de interés.

Por ejemplo, la secuencia de señal o la segunda secuencia de ácido nucleico para una proteína E de un virus del Zika o un fragmento funcional de la misma, se ubicará anterior a la secuencia de codificación de por lo menos una proteína E de un virus del Zika o un fragmento funcional de la misma, o la secuencia de señal o la cuarta secuencia de ácido nucleico para una proteína prM de un virus del Zika o un fragmento funcional de la misma se ubicará anterior a la secuencia de codificación de por lo menos una proteína prM o un fragmento de la misma. Las secuencias de señal y los péptidos señal divulgados en la presente memoria se pueden usar indistintamente para todos los aspectos y formas de realización de acuerdo con la presente divulgación. Por ejemplo, asimismo se puede usar una secuencia de señal de prM enfrente (es decir, en una dirección 5' en el nivel de ADN) de una secuencia que codifica una proteína E o un fragmento funcional de la misma y viceversa. Asimismo, se pueden usar dos secuencias de señal idénticas frente a una secuencia que codifica una proteína E o un fragmento funcional de la misma, o frente a la secuencia que codifica una proteína prM o un fragmento funcional de la misma de acuerdo con la presente divulgación. Las secuencias de señal pueden seleccionarse independientemente de entre una secuencia de señal endógena, o de una secuencia de señal de otro organismo, preferentemente de otro virus, más preferentemente de otro flavivirus, por ejemplo, un virus de la encefalitis japonesa, un virus de la fiebre amarilla, un virus del Nilo occidental, un virus del dengue, un virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, un virus de agente de fusión celular, un virus de Palm Creek, un virus de la encefalitis de San Luis, un virus del río Parramatta u otro virus del Zika. En particular, la secuencia de señal adecuada de acuerdo con la presente divulgación no está limitada a originarse a partir de un virus específico humano, ya que la secuencia de señal puede añadirse frente a la secuencia de codificación de interés para modular el tráfico intracelular y/o los propósitos de secreción, o potenciar la inmunogenicidad para las células T CD8+ (ver Quinan et al., ut supra). Las secuencias adecuadas se detallan a continuación y en el listado de secuencias adjunto.

La poliproteína del virus Zika generalmente se escinde mediante proteasas de la célula huésped, p. signalasa y furina (enzima celular de tipo subtilasa), así como la proteasa NS2B/NS3 viral en las proteínas estructurales C, prM/M y E (ver Lei et al., Science, vol. 353, no. 6298, 2016).

Las secuencias de señal o péptidos señal adecuados que representan la segunda y, preferentemente, la cuarta secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención que se deben utilizar frente a la región de codificación que codifica la proteína E de un virus del Zika o un fragmento funcional de la misma, y/o frente a la secuencia que codifica una proteína prM o un fragmento funcional de la misma y que representa una secuencia de señal "para" una proteína E o un fragmento funcional de la misma, y/o una proteína prM o un fragmento funcional de la misma de un virus del Zika puede derivar de este modo de una secuencia de la señal de secreción de melitina de abeja melífera (SEC ID N°.: 156, presente en pMelBac A, B y C, Invitrogen), un péptido señal de azurocidina humana (SEC ID N°.: 157), un péptido señal de albúmina sérica humana (SEC ID N°.: 158), un miembro 1 de la subfamilia B del receptor leucocitario tipo inmunoglobulina de Homo sapiens (SEC ID N°.: 159), un péptido señal de prolactina bovina (SEC ID N°.: 160), un complejo GP de poliproteína preglicoproteína, una secuencia de señal del virus de la coriomeningitis linfocítica (cepa Armstrong) (SEC ID N°.: 161), un péptido señal de receptor de insulina humana (SEC ID N°.: 162), un péptido señal BM-40 de *Drosophila melanogaster* (SEC ID N°.: 163), un péptido señal de la glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular (SEC ID N°.: 164), un péptido señal del

quimotripsinógeno B humano (SEC ID N°.: 165 ), un péptido señal de Interleucina-2 humana (SEC ID N°.: 166), un péptido señal de luciferasa *Gaussia princeps* (SEC ID N°.: 167, 168), o un péptido señal de HA de Influenza (SEC ID N°.: 169-171), un péptido señal E1 o E2 del virus de la hepatitis C (VHC) 1b, o un péptido señal artificial para el VHC (SEC ID N°.: 172-174), un péptido señal del activador del plasminógeno de tipo tisular humano (SEC ID N°.: 175, 176), o una secuencia que presenta por lo menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la secuencia de señal respectiva. Un experto puede definir fácilmente otras secuencias de señal adecuadas para usar junto con una secuencia que codifica una proteína E o un fragmento funcional de la misma, o una proteína prM o un fragmento funcional de la misma, derivada de un virus del Zika, ya que esas secuencias pueden identificarse mediante el análisis de secuencias y sobre la base de los datos disponibles para otros flavivirus y células huésped relevantes o de otros organismos adecuados para la expresión génica recombinante. Un kit de cribado adecuado para seleccionar la actividad del péptido de secuencia de señal más adecuado se proporciona como el conjunto de vectores de péptidos de señal de mamíferos (Sigma-Aldrich) que comprende un vector plasmídico para clonación molecular, PSF-CMV-PURO-NH2-INSULINSP - PLÁSMIDO DE SECRECIÓN DE INSULINA, un vector plasmídico para clonación molecular, PSF-CMV-PURO-NH2-BM40 - PLÁSMIDO DE SECRECIÓN DE BM40, un vector plasmídico para clonación molecular, PSF-CMV-PURO-NH2-VSV G - PLÁSMIDO DE SECRECIÓN DE VSV G, un vector plasmídico para clonación molecular, PSF-CMV-PURO-NH2-CHTP - PLÁSMIDO DE SECRECIÓN DE QUIMIOTRIPSINÓGENO HUMANO, un vector plasmídico para clonación molecular, PSF-CMV-PURO-NH2-IL-2 - PLÁSMIDO DE SECRECIÓN DE INTERLEUCINA-2, un vector plasmídico para clonación molecular, V-PURO-NH2-GAUS - PLÁSMIDO DE SECRECIÓN DE GAUSSIA (LUCIFERASA), un vector plasmídico para clonación molecular, PSF-CMV-PURO-NH2-ALB - PLÁSMIDO DE SECRECIÓN DE ALBÚMINA HUMANA, y un vector plasmídico para clonación molecular, PSF-CMV-PURO-NH2-HA/SP - PLÁSMIDO DE SECRECIÓN DE HA DE GRIPE, para comparar la actividad de ocho etiquetas secretoras/péptidos señal de mamíferos diferentes para identificar cuál es la más efectiva para la secreción de la proteína de interés. La etiqueta más eficiente dependerá naturalmente de la proteína de interés y asimismo de las células utilizadas, tal como es conocido por el experto.

En otra forma de realización particular, la cuarta molécula de ácido nucleico y/o la segunda molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención que codifica un péptido señal para una proteína prM o un fragmento funcional de la misma de un virus del Zika pueden codificar una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en una secuencia de señal prM del virus de la encefalitis de Murray Valley (SEC ID N°.: 177), un péptido señal del virus de la fiebre amarilla (SEC ID N°.: 178), un péptido señal del virus de Kunjin (SEC ID N°.: 179), un péptido señal del virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (SEC ID N°.: 180), un péptido señal del virus del dengue (SEC ID N°.: 181), un péptido señal del virus del Nilo Occidental (SEC ID N°.: 182), o preferentemente un péptido señal del virus de la encefalitis japonesa (SEC ID N°.: 183, 184), o una secuencia que presenta por lo menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la secuencia de señal/péptido señal respectivo.

En ciertas formas de realización, pueden preferirse péptidos señal de un virus de la encefalitis japonesa y pueden usarse frente a una secuencia que codifica una proteína E o un fragmento funcional de la misma, o frente a la secuencia que codifica una proteína prM o un fragmento funcional de la misma como una secuencia de señal adecuada, es decir, como la segunda y/o cuarta secuencia de ácido nucleico, de acuerdo con la presente divulgación.

En una forma de realización de acuerdo con los diversos aspectos de la presente divulgación, por lo menos una secuencia adicional que codifica una proteasa flaviviral, preferentemente por lo menos una proteasa NS2B y/o NS3 o un fragmento catalíticamente activo o variante de la misma de un flavivirus, particularmente un virus del Zika, puede usarse y coexpresarse junto con las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención para ayudar en el procesamiento adecuado de las moléculas de ácido nucleico después de la traducción, particularmente, si se prevé usar una construcción que implica una proteína de cápside (C) derivada de virus del Zika o un fragmento funcional de la misma como proteínas estructurales adicionales de un virus del Zika. El complejo de proteasa NS2B/NS3 escindirá un péptido señal para una proteína prM de un flavivirus en la porción N-terminal del péptido señal, mientras que una peptidasa señal escindirá el péptido señal en la porción C-terminal frente a la proteína prM.

Aunque la proteína E y, en cierta medida, asimismo los antígenos derivados de la proteína prM/M de un virus del Zika resultaron ser los candidatos más prometedores para las estrategias de vacunación, podría preverse, en ciertas formas de realización, construir una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica por lo menos una proteína C derivada de un virus del Zika, por ejemplo, tal como se muestra en cualquiera de SEC ID N°.: 14 a 26 y 88 a 108 en la posición de aminoácidos 6 a 122. En esas formas de realización, se prefiere que simultáneamente esté presente una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína no estructural NS2B (posiciones de aminoácidos 1376 a 1502 de SEC ID N°.: 14 a 26 y 88 a 108) y/o la proteasa NS3 (posiciones de aminoácidos 1520 a 1670 de SEC ID N°.: 14 a 26 y 88 a 108). La serina proteasa NS3 requiere NS2B como cofactor y posteriormente puede procesar la poliproteína derivada del virus del Zika.

En una forma de realización de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención, por lo menos una molécula de ácido nucleico, o la molécula de aminoácido codificada por la molécula de ácido nucleico, comprende

por lo menos una primera y opcionalmente una segunda y/o tercera y/o cuarta secuencia de ácido nucleico cuya(s) secuencia(s) de ácido nucleico se selecciona(n) de entre el grupo que consiste en SEC ID N°.: 53 a 56 o 63 y 64, o una secuencia que presenta por lo menos 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%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología de secuencia con éstas, siempre que la secuencia homóloga después de la expresión aún codifique un antígeno funcional del virus del Zika.

Los antígenos del virus del Zika que se muestran en SEC ID N°.: 53 a 56 o 63 y 64, que originalmente derivan de una secuencia de acuerdo con SEC ID N°.: 1 (CDS, GenBank: KU365777.1) o SEC ID N°.:14 (secuencia de poliproteína correspondiente) derivada del virus del Zika podrían expresarse y ensamblarse y, en combinación con una estructura principal del vector adecuada, proporcionar construcciones recombinantes con actividad inmunógena. Se pueden obtener resultados similares cuando se usan las secuencias altamente homólogas derivadas de otro serotipo del virus del Zika de acuerdo con cualquiera de SEC ID N°.: 2 a 13 o 67 a 87, y asimismo cualquier secuencia de acuerdo con los números de acceso de Genbank KJ776791.1, KU740184.1, KU647676.1, KU720415.1, KU501217.1, KU501216.1, KU365780.1, KU365779.1, KU365778.1, KU365777.1, KU312312.1, KF268950.1, KF268949.1, KF268948.1, KF383119.1, KF383118.1, KF383117.1, KF383116.1, KF383115.1, EU545988.1, DQ859059.1, KU681082.2 o KU681082.3, KU681081.2 o KU681081.3, KU744693.1, KU497555.1, KU707826.1, KU527068.1, NC\_012532.1, KU509998.1, KU501215.1, LC002520.1, AY632535.2, KU321639.1, DQ859064.1 o NC\_029055.1, o genomas de virus del Zika o virus de Spondweni altamente homólogos basados en la presente divulgación.

En formas de realización preferidas de acuerdo con los diversos aspectos de la presente divulgación, por lo menos una secuencia de ácido nucleico o por lo menos una molécula de ácido nucleico está optimizada por lo menos parcialmente con codones.

En un tercer aspecto de acuerdo con la presente invención, se proporciona un virus quimérico recombinante que comprende una estructura principal del vector tal como se define en las formas de realización del primer aspecto de la presente invención, y que comprende por lo menos una molécula de ácido nucleico de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención, o que comprende por lo menos una secuencia de ácido nucleico tal como se define en las formas de realización del primer aspecto de la presente invención.

Como se utiliza en este contexto, el término "virus quimérico recombinante" se refiere a un virus, que puede formar parte de una composición inmunógena o de vacuna, en el que la secuencia que codifica las partículas virales comprende una cantidad efectiva de un virus que contiene proteína E o un fragmento funcional de la misma que deriva de un serotipo de virus del Zika o de Spondweni y que opcionalmente comprende además una proteína estructural que es la prM o un fragmento funcional de la misma, y que posiblemente comprende una proteína de cápside o un fragmento funcional de la misma. Esta porción "de Zika" del virus quimérico puede derivar de cualquier virus del Zika. La segunda parte del virus quimérico, es decir, la estructura principal del vector es quimérica en el sentido que preferentemente deriva de una secuencia que no es de flavivirus, en la que la secuencia no derivada de flavivirus preferentemente comprende por lo menos una mutación atenuante, más preferentemente en la que la secuencia no derivada de flavivirus es una estructura principal del vector bien caracterizada y adecuada para las estrategias de vacunación. El uso de virus quiméricos recombinantes permite la provisión de composiciones inmunógenas, preferentemente de vacuna, que son altamente controlables con respecto a su perfil antigénico y de seguridad, el cual es muy deseable para proporcionar una preparación de vacuna segura para su uso.

En ciertas formas de realización, el virus quimérico recombinante o las partículas de virus representan la composición inmunógena de acuerdo con la presente invención.

En una forma de realización de acuerdo con el tercer aspecto de la presente invención, el virus quimérico está codificado por una secuencia de ácido nucleico seleccionada de entre el grupo que consiste en SEC ID N°.: 57 o 58, o una secuencia de SEC ID N°.: 60 o 192 que comprende por lo menos una secuencia de ácido nucleico adicional, o una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°.: 53 a 64, 27 a 39, 40 a 52, 109 a 129, o 130 a 150, en el caso de una secuencia de ácido nucleico, en la que por lo menos una secuencia adicional se inserta entre un sitio de restricción *Bsi*VI y *Bss*HI de SEC ID N°.: 60 o de SEC ID N°.: 192, o una secuencia que presenta por lo menos 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%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología de secuencia con éstas, siempre que la secuencia homóloga después de la expresión aún codifique partículas de virus recombinante quimérico.

Las partículas de virus recombinantes pueden comprender opcionalmente VLP o RSP. Por lo tanto, las partículas de virus recombinantes pueden comprender partículas infecciosas y no infecciosas de virus, similares a virus o subvirales.

Es conocido por el experto en la materia que una estructura principal del vector dada, particularmente una estructura principal del vector que presenta dimensiones tales como se muestran en SEC ID N°.: 60 o 192, puede tolerar ciertas mutaciones sin afectar la función o las características de virulencia del virus codificado. Por lo tanto,



dichas mutaciones silenciosas o tolerables pueden introducirse en una estructura principal del vector, pero ninguna mutación está comprendida por el rango de homología de secuencia presentado anteriormente que comprendería una mutación en una región del genoma codificado de la estructura principal del virus, que perturbaría su ciclo de replicación natural, o que revertiría el andamiaje de virus atenuado a una forma de virus no atenuado. Dicho rango de homología de secuencia es causado por el hecho de que una estructura principal del vector de virus puede, mediante tecnología recombinante, comprender posiciones optimizadas con codones (en teoría, una de cada tres posiciones de nucleótidos de ADN podría optimizarse para proporcionar una secuencia que todavía codifica la misma secuencia de aminoácidos que una secuencia no optimizada con codones), otras posiciones reguladoras o de antígeno y similares. Sin embargo, dichas modificaciones conducirían a una partícula de virus quimérico infeccioso y recombinante que comprende por lo menos un antígeno funcional del virus del Zika y, por lo tanto, están comprendidas en la presente divulgación.

En otra forma de realización, el virus recombinante o el virus quimérico puede comprender una secuencia de acuerdo con una cualquiera de SEC ID N°: 53 a 56 o 61 a 66, o una secuencia que presenta por lo menos 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%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología de secuencia con éstas, siempre que la secuencia homóloga, opcionalmente después de la expresión, aún codifique partículas de virus recombinante (quimérico).

En un aspecto adicional, se proporciona una célula huésped que comprende por lo menos una molécula de ácido nucleico, o que comprende por lo menos una secuencia de ácido nucleico, o que comprende por lo menos un virus quimérico recombinante de acuerdo con la presente divulgación.

En un aspecto adicional de acuerdo con la presente divulgación, se proporciona un método para producir un virus quimérico recombinante de acuerdo con el tercer aspecto de la presente invención, o para producir una composición inmunógena de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, comprendiendo el método las etapas siguientes: (i) insertar por lo menos una secuencia de ácido nucleico tal como se define en el primer aspecto de la presente invención, o insertar por lo menos una molécula de ácido nucleico de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención en una estructura principal del vector tal como se define para el primer aspecto de la presente invención para ligar operativamente la secuencia o molécula de ácido nucleico y la estructura principal del vector para obtener una secuencia de virus quimérico recombinante; (ii) infectar por lo menos una célula huésped con por lo menos una secuencia de virus quimérico recombinante obtenida en la etapa (i) para obtener una muestra de virus; (iii) opcionalmente: clarificar la muestra de virus de la etapa (ii); (iv) opcionalmente: purificar la muestra de virus clarificado de la etapa (iii); (v) opcionalmente: formular por lo menos un virus quimérico recombinante con por lo menos un vehículo y/o excipiente farmacéutica y/o veterinariamente aceptable; (vi) obtener un virus quimérico recombinante, o una composición inmunógena.

En el contexto de la obtención de partículas de virus purificadas, "obtenida" u "obtener" significa que las partículas respectivas pueden obtenerse directamente de una etapa cromatográfica sin más etapas de procesamiento, purificación o pulido, mientras que tales etapas posteriores adicionales no se excluyen de acuerdo con los métodos de la presente invención. Dicho procesamiento posterior adicional puede comprender purificación adicional, por cromatografía o por filtración, pulido, intercambio de solución amortiguadora y similares para lograr el fraccionamiento diferencial de los compuestos deseados, para producir purezas aún mayores, o para proporcionar dicho producto purificado en un sistema amortiguador adecuado.

De acuerdo con la presente divulgación, el término "infeccioso" implica que las partículas de virus infecciosas después de la producción en una célula huésped, preferentemente una célula huésped o población celular que comprende más de una célula huésped de interés, portan todas las moléculas necesarias y se ensamblan de manera que son capaces de reinfectar otra población celular, célula huésped o sujeto de interés. Preferentemente, las partículas de virus infecciosas, que opcionalmente comprenden viriones y/o partículas similares a virus (VLP) no replicantes, o partículas subvirales recombinantes (RSP) no replicantes, o una mezcla de las mismas, obtenidas mediante los métodos de acuerdo con la presente invención son adecuadas como composiciones inmunógenas o de vacuna tal como se obtienen directamente por medio de los métodos divulgados en la presente memoria. Dado que las estructuras principales de vectores de acuerdo con la presente invención no son estructuras principales de vectores de virus de tipo silvestre, sino estructuras principales de vectores altamente modificados, probados y atenuados, el término "infeccioso" describe principalmente la capacidad de una partícula de virus resultante para entrar en una célula huésped mediada por sus proteínas derivadas de virus expresadas en la superficie que pueden interactuar con moléculas receptoras y de reconocimiento en un huésped o célula objetivo, mientras que el virus recombinante y modificado debido a modificaciones extensas y atenuación no causará síntomas de enfermedad como el virus de tipo silvestre del que deriva. Como se detalló anteriormente, las VLP y/o RSP carecen de información genética y, por lo tanto, no son replicativas. Dado que dichas partículas comprenden proteínas estructurales derivadas de un virus nativo en la superficie de sus partículas y dichas proteínas estructurales, o los antígenos de las mismas, pueden interactuar con células y receptores dentro de una célula huésped, las VLP y/o RSP asimismo pueden interactuar con una célula del sistema inmunitario adaptativo y/o innato de un sujeto, o pueden ser captados por una célula huésped para inducir una respuesta inmunitaria.

El término “que codifica” en conexión con una secuencia de ácido nucleico que codifica partículas de virus infecciosas o quiméricas y recombinantes de acuerdo con la presente invención significa que la secuencia de ácido nucleico proporciona la información genética para la transcripción y, para los polipéptidos, asimismo la traducción de los antígenos derivados del virus del Zika y una estructura principal del vector operativamente ligada a ésta. Naturalmente, las partículas del virus quimérico pueden contener material adicional, por ejemplo, en la envoltura, cuando se liberan de una célula huésped después de la gemación de la membrana celular cuyo material deriva de la célula huésped.

De acuerdo con todos los aspectos de la presente divulgación, los términos “clarificado” o “clarificación” se refieren a una etapa para eliminar impurezas grandes relacionadas con el producto o proceso de un producto a granel que se debe clarificar. En el contexto de la presente invención, el producto a granel puede ser las partículas de virus quimérico recombinante y/o las VLP y/o las RSP producidas y liberadas de una población celular o de una célula huésped. Por lo tanto, la clarificación únicamente presenta como objetivo eliminar las células y los restos celulares de las células huésped infectadas con y que producen un virus. La clarificación no implica una separación específica del analito, es decir, el virus quimérico, partículas de virus, partículas similares a virus o partículas subvirales recombinantes, con el objetivo de lograr una alta pureza para eliminar las impurezas adicionales relacionadas con el producto y el proceso. Los métodos comunes para la clarificación son la centrifugación y la microfiltración, incluyendo la filtración de flujo tangencial, la ultracentrifugación, la filtración por cartuchos y similares, que son familiares para el experto en el campo relevante. En el contexto de la clarificación de un producto a granel que comprende partículas de virus infeccioso recombinante derivadas de un andamiaje de virus del sarampión, se debe evitar la centrifugación, ya que los procesos de centrifugación no son fácilmente escalables en condiciones de GMP o existe un mayor riesgo de contaminación del producto deseado. Por lo tanto, de acuerdo con una forma de realización del segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un método conforme, en el que la clarificación se realiza por un método distinto a la centrifugación, preferentemente, en el que la clarificación se realiza por un método de filtración que incluye, entre otras, filtraciones de profundidad o filtración de membrana. Por medio de la filtración o cualquier técnica de clarificación que dependa de la adsorción como principio de separación, se debe elegir un material de filtro que no muestre una unión o modificación inespecífica de las partículas infecciosas del virus de sarampión.

En una forma de realización de acuerdo con el método anterior, se proporciona un método que comprende además una etapa de purificación (iv), en el que la etapa de purificación comprende la purificación por medio de cromatografía, opcionalmente, en el que la purificación es seguida por una etapa de pulido adicional.

En una forma de realización de todos los aspectos de acuerdo con los métodos de la presente invención, una etapa de purificación da como resultado productos virales que presentan un contenido reducido de otras impurezas relacionadas con el proceso. Dichas impurezas relacionadas con el proceso comprenden, pero no se limitan a, células huésped, desechos celulares, contaminantes proteicos, ya sea como resultado de aditivos de cultivos celulares o de enzimas añadidas durante el cultivo y procesamiento, un microportador utilizado para el cultivo de células huésped o ácidos nucleicos extraños que no pertenecen a la célula huésped ni al virus infeccioso recombinante ni a sus partículas de interés.

El método de acuerdo con el aspecto anterior puede comprender una etapa de incubación para incubar por lo menos una célula huésped a una temperatura en el intervalo de 32.0°C +/- 4°C, preferentemente a una temperatura en el intervalo de 32.0°C +/- 1°C con por lo menos una secuencia de virus quimérico recombinante para obtener una muestra de virus, en el que una muestra de virus representa partículas de virus quimérico recombinante expresadas y liberadas de la célula huésped, en el que la muestra de virus puede comprender partículas de virus infecciosas y/o VLP y/o RSP.

Como se utiliza en la presente memoria, una “muestra de virus” se refiere a una muestra que puede obtenerse de una célula huésped infectada durante las diversas etapas de los métodos de acuerdo con la presente solicitud. Por lo tanto, el término puede referirse a una muestra obtenida del sobrenadante o una muestra obtenida del lisado de una célula. Se puede usar una muestra de virus para una clarificación y/o purificación adicional, tal como se describe en la presente memoria, o para fines de análisis, por ejemplo, para determinar la secuencia correcta de un genoma de virus transcrito o para el análisis de viriones de virus y/o partículas similares a virus y/o partículas subvirales recombinantes.

De acuerdo con las formas de realización que usan la purificación, las partículas de virus quimérico recombinante purificadas se obtienen habitualmente en una o más fracciones correspondientes al pico del producto de la etapa de elución por cromatografía. La concentración de ADN contaminante a la que se hace referencia a continuación se refiere a la concentración de ADN detectada dentro de 1 ml de una fracción que comprende las partículas de virus infeccioso recombinante purificadas que derivan de un andamiaje del virus del sarampión. En caso de que exista más de un pico de producto de la etapa de elución por cromatografía que comprende las partículas de virus quimérico recombinante purificadas que derivan de un andamiaje del virus del sarampión, es pertinente una concentración menor a 33.33 ng/ml, o preferentemente menos, de ADN de célula huésped contaminante para cada una de las fracciones individuales.

Dependiendo de la célula huésped de interés, la multiplicidad de infección (MOI) prevista utilizada para la infección con una partícula de virus quimérico recombinante de interés puede variar tal como es conocido por un experto en el campo de la virología. La MOI generalmente depende de la dosis infectiva en cultivo tisular (TCID). Los métodos alternativos para el método de TCID son un ensayo de placas, un ensayo de enfoque inmunológico o reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa ("qPCR"). De la manera que se usa en la presente memoria, la TCID<sub>50</sub> se refiere a la mediana de la dosis infectiva de cultivo tisular, es decir, la cantidad de un agente patógeno que producirá un cambio patológico en el 50% de los cultivos celulares inoculados. Es posible determinar una MOI/TCID<sub>50</sub> adecuada por medio de pruebas comunes, por ejemplo, el método de Kärber o el método de Reed y Muench.

En ciertas formas de realización, las células huésped adecuadas para la propagación y producción de material de virus quimérico recombinante de acuerdo con la presente invención se seleccionan de entre el grupo que consiste en células Vero, células de fibroblasto de embrión de pollo, células HEK293, células HeLa, células pulmonares de mono rhesus fetal o células MRC5. Un experto en la materia puede definir fácilmente otras células huésped adecuadas dependiendo de la estructura principal del vector utilizada de acuerdo con la presente divulgación.

En ciertas formas de realización de acuerdo con el método anterior de la presente invención, se proporciona además un método que comprende adicionalmente una etapa de purificación adicional, que comprende: purificar adicionalmente el virus recombinante, el virus quimérico recombinante o la composición inmunógena, es decir, su constituyente de virus farmacéuticamente activo, mediante filtración, centrifugación, filtración de flujo tangencial, filtración de membrana, purificación con medios injertados, extracción acuosa en dos fases, precipitación, intercambio de solución amortiguadora, diálisis o cromatografía, incluyendo la cromatografía de exclusión por tamaño para separar las partículas de virus infeccioso recombinante purificadas que derivan de un andamiaje del virus del sarampión en una fracción que contiene viriones y otra fracción que contiene partículas similares a virus o partículas subvirales recombinantes. Dicha forma de realización es especialmente útil en caso de que la región antigénica insertada como secuencia de ácido nucleico en una estructura principal del vector atenuado, preferentemente una estructura principal del vector derivado del virus del sarampión, deba separarse adicionalmente en una fracción que contenga los viriones competentes de replicación del material genético que contiene el virus del sarampión y las VLP y/o las RSP ensambladas por sí mismas a partir de los antígenos de por lo menos un virus del Zika, en el que las VLP y las RSP carecen de cualquier material genético. Por lo tanto, poseen antígenos de superficie relevantes, pero no pueden propagarse en una célula huésped, lo que hace que las VLP y las RSP sean un objetivo interesante para varias aplicaciones en inmunología.

Todavía en otra forma de realización adicional de acuerdo con el método anterior, el método comprende una etapa adicional, que comprende (vii) separar las partículas subvirales recombinantes de las partículas infecciosas.

En una forma de realización, se proporciona además un método que comprende adicionalmente una etapa adicional de pulido o intercambio de solución amortiguadora, que comprende: purificar y/o pulir adicionalmente las partículas de virus infeccioso recombinante derivadas de un andamiaje de virus del sarampión o someter las partículas de virus infeccioso recombinante derivadas de un andamiaje de virus del sarampión a un intercambio de solución amortiguadora por filtración, centrifugación, filtración de flujo tangencial, filtración de membrana, purificación con medios injertados, extracción acuosa en dos fases, precipitación, intercambio de solución amortiguadora, diálisis o cromatografía, incluyendo la cromatografía de exclusión por tamaño, para pulir adicionalmente las partículas de virus o para proporcionar un intercambio de solución amortiguadora adecuado posiblemente necesario para la posterior fabricación de un producto deseado. Tal etapa adicional de pulido o intercambio de solución amortiguadora es además especialmente adecuada para disminuir adicionalmente la cantidad de ADN o proteínas séricas relacionadas con el proceso utilizadas durante el proceso de fabricación de las partículas de virus derivadas de un andamiaje de virus del sarampión de acuerdo con la presente invención y, por lo tanto, alcanzar un mayor grado de pureza en términos de contaminantes proteicos en las partículas de virus infeccioso recombinante purificadas y en una composición inmunógena o de vacuna que se puede obtener a partir de las mismas. Adicionalmente, dicha etapa se puede aplicar para separar adicionalmente las VLP o RSP de las partículas de virus quimérico infeccioso y recombinante, que comprenden preferentemente un andamiaje de virus del sarampión y por lo menos un antígeno del virus del Zika.

Todas las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente divulgación pueden optimizarse con codones opcionalmente. Esto implica que el uso de codones de una secuencia de ácido nucleico dada puede modificarse para que sea compatible con el uso de codones de una célula huésped de interés para permitir mejores tasas de transcripción, procesamiento y/o estabilidad de ARNm, y/o tasas de traducción, y/o plegamiento de proteínas y, por lo tanto, la expresión de secuencias de aminoácidos funcionales en una célula huésped de interés. Un experto en la materia con conocimientos sobre el código genético y el uso de codones de una célula huésped objetivo puede adaptar fácilmente una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente divulgación sin efectuar un cambio en la secuencia de aminoácidos resultante después de la traducción. Por lo tanto, las secuencias optimizadas con codones de las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención asimismo se comprenden en la presente divulgación.

En una forma de realización particular de la presente invención, la construcción inmunógena se prepara clonando una secuencia de polinucleótidos que codifica por lo menos una proteína estructural o una pluralidad de proteínas

estructurales derivadas de un serotipo de virus del Zika en el ADNc que codifica el ARN antígeno (+) de longitud completa de un virus del sarampión atenuado. Alternativamente, una construcción de ácido nucleico de la invención se puede preparar usando etapas de síntesis de fragmentos de ácido nucleico o polimerización a partir de una plantilla, incluyendo PCR. A continuación, por lo menos una secuencia de polinucleótidos o ácidos nucleicos que codifica por lo menos una proteína de por lo menos un virus del Zika se clona en una ATU (unidad de transcripción adicional) insertada en el ADNc del virus del sarampión. Por lo general, existe una ATU por construcción. Las secuencias ATU normalmente comprenden tres regiones potenciales de inserción de un ácido nucleico y comprenden, además, para uso en etapas de clonación en ADNc de MV, secuencias que actúan en cis necesarias para la expresión dependiente de MV de un transgén recombinante, tal como un promotor que precede a un gen de interés, en el ADNc de MV, el inserto representado por el polinucleótido que codifica la(s) proteína(s) viral(es) insertada(s) en un casete de sitios de clonación múltiple. La ATU se localiza ventajosamente en la secuencia N-terminal de la molécula de ADNc que codifica la cadena de ARN de longitud completa (+) del antígeno del MV, por ejemplo, antes del gen N (ATU1), y, en el contexto de la presente divulgación, preferentemente se ubica entre los genes P y M de este virus (ATU2). Alternativamente, puede ubicarse entre los genes H y L (ATU3). Una construcción ejemplificativa que comprende una ATU3 y una inserción, en este caso un gen que codifica una proteína verde fluorescente ("GFP"), clonada dentro de la ATU3 puede derivar de SEC ID N°.: 153. En la posición 9333 a 9338 de SEC ID N°.: 153, se ubica en un sitio de restricción *Bsi*VI que representa el sitio de clonación 5' para un gen heterólogo de interés, preferentemente por lo menos un gen o fragmento del mismo que codifica por lo menos un antígeno del virus del Zika. En la posición 10059 a 10064 de SEC ID N°.: 153, se ubica en un sitio de enzima de restricción *Bss*HII que representa el sitio de clonación 3' para un gen heterólogo de interés, preferentemente por lo menos un gen o fragmento del mismo que codifica por lo menos un antígeno del virus del Zika. Por lo tanto, una inserción de interés puede posicionarse dentro del sitio de clonación de ATU3 (posición 9339 a 10058, incluyendo un codón de inicio ATG y un codón de terminación TAG, respectivamente, en SEC ID N°.: 153 que muestra un inserto GFP como ejemplo) como una alternativa adicional a la clonación en un sitio ATU2 o ATU1. Se ha observado que la transcripción del ARN viral de MV sigue un gradiente del extremo 5' al 3'. Esto explica que, cuando se inserta en el extremo 5' de la secuencia codificante del ADNc, la ATU permita una expresión más eficiente de la secuencia de ADN de ácido nucleico recombinante heteróloga. Sin embargo, la secuencia ATU puede ubicarse en cualquier posición de SEC ID N°.: 59 siempre que no interrumpa una secuencia de codificación o una secuencia reguladora de la misma.

Además, de acuerdo con cualquier aspecto de la presente invención, las moléculas de ácido nucleico divulgadas pueden modificarse adicionalmente por medio de biología molecular para introducir una secuencia reguladora nueva o modificada, sitio de unión/corte de enzima de restricción, así como diversas secuencias de ácido nucleico que codifican una región antigénica de interés, preferentemente respetando la "regla de seis" identificada anteriormente. Esta regla se estableció para ciertos virus que pertenecen a la familia *Paramyxoviridae*, de la que deriva/pertenece filogenéticamente el vector del virus del sarampión de la presente divulgación. Esta regla deriva del hecho de que para que todo el proceso de síntesis de ARN, replicación del genoma y encapsidación a través del cual el virus del sarampión procede en una célula huésped para que sea eficiente para generar moléculas genómicas y antígenicas de longitud completa, es necesario que el genoma viral esté encerrado dentro de su capa de proteína, específicamente las proteínas N. De lo contrario, la maquinaria de replicación de virus encontrará problemas para comenzar la replicación. Cada molécula N se asocia exactamente con 6 nucleótidos, lo que explica la razón por la cual estos virus requieren que sus genomas sean múltiplos de seis. Por lo tanto, es evidente que puede realizarse una variedad de modificaciones del andamiaje del virus del sarampión con la condición de que todavía resulte en un andamiaje del virus del sarampión capaz de infectar una célula huésped. Por lo tanto, se pueden aplicar medios como la optimización de codones y similares, siempre que no se introduzca ninguna mutación que pueda cambiar las propiedades funcionales de una secuencia reguladora o una proteína estructural del virus del sarampión. Además, en el caso de los viriones que comprenden material genético, debe asegurarse por medio de la secuenciación que las partículas de virus infeccioso recombinante purificadas resultantes que derivan de un andamiaje del virus del sarampión no comprenden una mutación que convierta en virulento al virus atenuado. Dichos métodos de secuenciación de ácidos nucleicos, incluyendo la secuenciación profunda, para medios de confirmación de secuencia pertenecen al conocimiento general común de un experto en el campo de la biología molecular y la virología, y se pueden aplicar en cualquier etapa de los métodos de acuerdo con la presente divulgación.

Lo mismo es válido para las VLP o RSP que pueden no comprender mutaciones potencialmente dañinas en las secuencias que codifican sus proteínas estructurales, es decir, los antígenos del virus del Zika de acuerdo con la presente invención. La formación de VLP o RSP puede controlarse, entre otros, mediante microscopía electrónica. Para este fin, se pueden recolectar, por ejemplo, sobrenadantes de células infectadas, por ejemplo, células Vero, después de 36 h de infección con una MOI de 0.0001 a 1, preferentemente con una MOI de 0.0001 a 0.1, después de la infección con una construcción que comprende SEC ID N°.: 57 o 58. A continuación, los sobrenadantes se clarifican por centrifugación a 3000 rpm durante 30 minutos, se colocan en capas sobre un amortiguador de sacarosa al 20% en solución salina amortiguada con fosfato ("PBS") y se centrifugan a 41,000 rpm durante 2 h en un rotor SW41. Posteriormente, los sedimentos se resuspenden en PBS con BSA al 1%, y se analizan mediante microscopía electrónica. La tinción negativa se lleva a cabo con acetato de uranilo al 2% en rejillas de cobre recubiertas con carbono y descarga de resplandor justo antes del uso. Las muestras se pueden observar a 80 kV con un microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM1200 (Tokio, Japón). Las imágenes se registraron usando una cámara Eloise Keenview y el Analysis Pro-software, versión 3.1 (Eloise SARL, Roissy, Francia).

En una forma de realización de acuerdo con el método anterior de la presente invención, la muestra de virus se trata con una ADNasa, preferentemente con una benzonasa, una ADNasa endonucleasa modificada genéticamente *Serratia*, antes o después de la clarificación. En una forma de realización, el tratamiento con ADNasa se realiza antes de la etapa de clarificación. En otra forma de realización, el tratamiento con ADNasa se realiza con una muestra de virus clarificado que comprende partículas de virus infeccioso recombinante derivadas de un andamiaje del virus del sarampión. Dicha etapa cumple dos funciones: en primer lugar, los ácidos nucleicos no deseados en forma de ADN pueden escindirse para permitir una eliminación más eficaz del ADN durante la purificación adicional. En segundo lugar, la muestra de virus que puede obtenerse de este tratamiento reduce la viscosidad del material resultante. Dicha viscosidad más baja da como resultado un rendimiento mejorado del material en la cromatografía, ya que de lo contrario el material obstruiría fácilmente una columna que comprende la fase estacionaria de interés.

En una forma de realización de acuerdo con el método anterior de la presente invención, no se lleva a cabo ningún tratamiento con ADNasa.

La cromatografía se refiere a un principio de separación o un procedimiento en el que una mezcla biológica o química de sustancias que comprenden un analito transportado por un líquido o un gas se separa en sus componentes como resultado de la distribución diferencial de los solutos entre una fase estacionaria y una móvil a medida que fluyen alrededor de o sobre un líquido estacionario, gel o fase sólida como fase estacionaria. Pasar a través de la fase estacionaria conduce a una retención del analito que depende, entre otras cosas, de la interacción entre el analito y la fase estacionaria y sus características de difusión dictadas por las propiedades químicas y físicas del analito. En el contexto de la presente invención, el analito está representado por las partículas de virus infeccioso recombinante derivadas de un andamiaje del virus del sarampión. Dado el tamaño del genoma descrito anteriormente del andamiaje del virus del sarampión y el enorme tamaño de partícula resultante de 100 a 1000 nm para el virus encapsulado y las propiedades fisicoquímicas de las partículas del virus infeccioso o las partículas similares a virus derivadas del andamiaje del virus del sarampión, hasta el momento no existe una estrategia eficiente basada en la cromatografía para la purificación de partículas de virus infeccioso derivadas del virus del sarampión. Los intentos de purificar el virus del sarampión o una partícula viral derivada del andamiaje del virus del sarampión se acompañaron de una gran pérdida del material que se purificaría hasta el momento y no pudieron llevarse a cabo en un grado industrial bajo condiciones de GMP.

En una forma de realización de acuerdo con los diversos aspectos de la presente divulgación, la purificación por cromatografía se realiza usando una fase estacionaria, preferentemente una fase estacionaria que presenta una disposición monolítica, en la que la fase estacionaria presenta un tamaño de poro de por lo menos 5  $\mu\text{m}$ , preferentemente un tamaño de poro de por lo menos 6  $\mu\text{m}$ , y más preferentemente un tamaño de poro de por lo menos 7  $\mu\text{m}$ , o en la que la purificación por cromatografía se realiza usando una fase estacionaria que presenta una disposición monolítica, en la que el modo de adsorción es una interacción hidrófoba.

En el campo de la cromatografía, el experto en la materia sabe que las fases estacionarias, especialmente en el contexto de la purificación de un virus, pueden consistir en lechos porosos preenvasados, una matriz que consiste en adsorbentes de membrana o pueden presentar una disposición monolítica. Para todos los diferentes tipos de fases estacionarias, existen varios modos de separación o modos de adsorción que se clasifican según su principio de interacción y/o separación del analito que se debe separar/purificar. Dichos modos incluyen la cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, incluyendo la cromatografía de intercambio aniónico y de cationes, interacción hidrófoba, exclusión por tamaño, o una combinación de las mismas. Con respecto a los métodos de acuerdo con la presente invención, los adsorbentes de membrana, y aún más preferentemente las fases estacionarias monolíticas, son especialmente ventajosos, ya que muestran una alta capacidad de unión, así como una alta velocidad de flujo posible. Además, se debe aplicar baja presión. Lo anterior hace que los métodos de acuerdo con la presente solicitud sean especialmente adecuados para virus grandes y/o encapsulados.

En una forma de realización de acuerdo con el método de la presente invención, la cromatografía se basa en técnicas de cromatografía convectiva, que incluyen una fase estacionaria dispuesta monolíticamente o un adsorbente de membrana como fase estacionaria. Esto permite la purificación de partículas de virus quimérico infeccioso recombinante, que comprenden opcionalmente viriones y/o partículas similares a virus y/o RSP, incluso para partículas estéricamente exigentes de virus enormes que presentan un diámetro grande, o para partículas que presentan características superficiales peculiares. Además, dichas fases estacionarias específicas proporcionan características mejoradas con respecto a su capacidad, resolución, el rendimiento del producto de virus que se debe purificar, y las altas velocidades de flujo posibles. En una forma de realización de acuerdo con la presente invención, la etapa de purificación de las partículas de virus quimérico infeccioso recombinante por medio de cromatografía después de la clarificación se realiza usando una estrategia de interacción hidrófoba. Dicha estrategia para purificar la muestra de virus crudo obtenida después de la clarificación es especialmente adecuada para partículas derivadas del andamiaje del virus del sarampión, ya que otros modos de separación, tales como el intercambio iónico, podrían no ser adecuados o requerir una tediosa optimización del proceso para las partículas de virus infeccioso basadas en andamiajes del virus del sarampión, ya que las enormes partículas de virus derivadas del virus del sarampión, los viriones y/o las partículas similares al virus derivadas de éste, y su punto

5 isoelectrico, así como la gran área superficial de un virus de grupos reactivos asociados con éste, son propensos a provocar interacciones inespecíficas en caso de que se utilice un modo de intercambio iónico para la interacción que dificulta una purificación eficiente, en la que la pérdida de material viral debe ser lo más baja posible. Se proporciona una fase estacionaria monolítica adecuada ejemplificativa en una columna CIMmultus™ (BIA Separations) con un tamaño de poro optimizado de por lo menos 4 µm, preferentemente de por lo menos 5 µm, y más preferentemente de por lo menos 6 µm. Un posible ligando que define el modo de purificación y, por lo tanto, la química superficial de la fase estacionaria monolítica es un ligando OH, mientras que los monolitos OH resultantes son muy hidrófilos debido a la alta densidad de los grupos hidroxilo, lo que los hace adecuados en una estrategia de purificación por interacción hidrófoba de las partículas de virus infeccioso derivadas de un andamiaje del virus del sarampión de acuerdo con los métodos de la presente invención.

15 En una forma de realización, la cromatografía de intercambio iónico puede, sin embargo, usarse para purificar partículas similares a virus o partículas subvirales recombinantes obtenibles de acuerdo con los métodos de la presente invención. Debido al menor tamaño en general de las VLP o RSP y sus características superficiales definidas, la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía de exclusión por tamaño, y una combinación o mezcla de las mismas en forma de varias etapas cromatográficas, pueden usarse para purificar aquellas partículas no replicantes de acuerdo con la presente invención que comprenden por lo menos un antígeno derivado del virus del Zika.

20 En otra forma de realización de la presente invención, se usa la cromatografía de exclusión por tamaño como modo de interacción para separar la solución madre de virus clarificado, en la que el tamaño de poro del material de fase estacionaria es por lo menos 5 µm, preferentemente por lo menos 6 µm, y más preferentemente por lo menos 7 µm.

25 En otra forma de realización de la presente invención dirigida a la purificación adicional de VLP o RSP, se usa la cromatografía de exclusión por tamaño como modo de interacción para separar la solución madre de virus clarificado, en la que el tamaño de poro del material de fase estacionaria es menor que 5 µm, preferentemente menor que 4 µm, y más preferentemente menor que 3 µm.

30 En una forma de realización adicional de acuerdo con el método de la presente invención, se usa la cromatografía de exclusión por tamaño, de intercambio iónico o interacción hidrófoba para purificar adicionalmente las partículas de virus quimérico infeccioso recombinante basadas en una estructura principal del virus del sarampión y que comprenden por lo menos un antígeno funcional del virus del Zika después una primera purificación cromatográfica. Asimismo son posibles otros métodos de purificación, tales como la filtración de flujo tangencial, la purificación con medios injertados, la extracción acuosa en dos fases o la precipitación. Dichos modos de purificación son especialmente adecuados para disminuir adicionalmente la cantidad de ADN o proteínas séricas relacionadas con el proceso utilizados durante el proceso de fabricación de las partículas de virus derivadas de un andamiaje del virus del sarampión de acuerdo con la presente invención y, por lo tanto, alcanzar un mayor grado de pureza en términos de contaminantes proteicos en las partículas de virus infeccioso recombinante purificadas y en una composición inmunógena o de vacuna que se puede obtener a partir de las mismas. Alternativamente, de acuerdo con otra forma de realización de la presente invención, la segunda etapa de purificación para eliminar adicionalmente los contaminantes proteicos relacionados con el proceso se lleva a cabo mediante la filtración de flujo tangencial. Preferentemente, el nivel de contaminantes proteicos totales relacionados con el proceso contaminante en la muestra purificada, es decir, en por lo menos una fracción que comprende las partículas de virus infeccioso, obtenidas directamente de la primera etapa cromatográfica de acuerdo con la presente invención, es inferior a 1 ng/ml, más preferentemente es inferior a 100 pg/ml, incluso más preferentemente es inferior a 10 pg/ml, y más preferentemente es inferior a 1.1 pg/ml.

50 Todavía en otra forma de realización de acuerdo con la presente invención, se usa la cromatografía de afinidad para purificar las partículas de virus infeccioso recombinante derivadas de un andamiaje del virus del sarampión como una segunda etapa de cromatografía. Dicha forma de realización es especialmente adecuada en caso de que esté presente un anticuerpo que se une a un antígeno expresado y presentado en las partículas de virus infeccioso recombinante, o cuando una etiqueta se ha fusionado y ligado operativamente a la secuencia de ácido nucleico que codifica las partes expuestas de las partículas de virus infeccioso recombinante.

55 Un experto en la materia es consciente de que existen varias columnas y sistemas de cromatografía que son adecuados para llevar a cabo los métodos usando las técnicas de separación y las fases estacionarias tal como se detalla en la presente memoria.

60 En una forma de realización adicional de acuerdo con el método anterior, la por lo menos una célula huésped se selecciona de entre el grupo que consiste en células Vero (células de riñón derivadas del mono verde africano), células de fibroblasto de embrión de pollo, células HEK293 (células de riñón embrionario humano) o cualquier derivado de las mismas, células HeLa (células epiteliales del cuello uterino derivadas de *Homo sapiens*), células pulmonares de mono rhesus fetal, o células MRC5 (células de fibroblastos pulmonares derivadas de *Homo sapiens*). Las células Vero, por ejemplo, la línea celular de referencia de la OMS Vero RCB 10-87 establecida en 1987 y sometida a una amplia gama de pruebas para establecer su idoneidad para la producción de vacunas o

ATCC-CRL-1587™, las células de fibroblasto de embrión de pollo, por ejemplo, ATCC® CRL-12203™, las células HEK293, por ejemplo, ATCC® CCL-1573™, las células HeLa, por ejemplo, ATCC® CCL-2™ o ATCC® CCL-2™, o las células MRC5, por ejemplo, ATCC® CCL-171™. En principio, cualquier línea celular es adecuada en el contexto la presente invención, siempre que pueda ser infectada con un virus quimérico recombinante de acuerdo con la presente divulgación y siempre que soporte un ciclo de replicación del mismo. Preferentemente, la población celular que comprende por lo menos una célula o por lo menos una célula huésped es recombinante, ya que una célula huésped representa un material estandarizado y bien caracterizado, que son requisitos previos indispensables para ciertas estrategias de GMP y con respecto a cuestiones de seguridad. Además, un experto en la materia sabe que ciertas líneas celulares requieren permiso para su liberación, por ejemplo, de la OMS, si están destinadas a la producción de una vacuna o un producto biológico, o para el desarrollo de nuevos candidatos de vacunas o productos biológicos siguiendo los requisitos de la FDA de EE.UU. Dicho permiso puede obtenerse por las autoridades pertinentes, tal como es conocido por un experto. La población celular o por lo menos una célula huésped utilizada en el contexto de la presente invención, por ejemplo, como un banco celular maestro, únicamente se usarán hasta que se alcance un cierto número de pases para evitar el riesgo de que una línea celular acumule mutaciones que la conviertan en potencialmente tumorigénica. Preferentemente, el número de pases celulares no será superior a, por lo tanto, 170, preferentemente no será superior a 160, más preferentemente no será superior a 155, y todavía más preferentemente no será superior a 150 pases.

Se pueden usar células adicionales adecuadas para producir una composición inmunógena o partículas de virus quimérico recombinante de acuerdo con la presente invención, siempre que tales células sean susceptibles a la estructura principal del vector del virus quimérico y promuevan la transcripción y, posiblemente, la traducción de las secuencias de ácido nucleico comprendidas mediante un virus quimérico recombinante de acuerdo con la presente invención, y posteriormente la formación de partículas de virus quimérico recombinante que comprenden por lo menos un antígeno del virus del Zika, que sean adecuadas como una composición inmunógena.

En un aspecto adicional de acuerdo con la presente divulgación, se proporciona una composición inmunógena, preferentemente una composición de vacuna, que comprende una composición inmunógena de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, o que comprende por lo menos una molécula de ácido nucleico según el segundo aspecto de la presente invención, o que comprende por lo menos un virus quimérico recombinante de acuerdo con el tercer aspecto de acuerdo con la presente invención, para su uso en un método para prevenir o tratar una enfermedad del virus del Zika en un sujeto.

De acuerdo con este aspecto de la presente divulgación, de este modo se proporciona un método terapéutico, que comprende un método profiláctico y/o terapéutico, en el que una composición inmunógena de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, o una molécula de ácido nucleico de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención, o un virus quimérico recombinante de acuerdo con el tercer aspecto de acuerdo con la presente invención, se usa para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto para prevenir o tratar una enfermedad del virus del Zika en dicho sujeto tras la administración mediante un programa de dosis única o de dosis múltiple.

En una forma de realización, la composición inmunógena o la composición de vacuna para uso en un método para prevenir o tratar una enfermedad del virus del Zika se caracteriza por presentar un contenido de ADN de célula huésped contaminante de menos de 100 pg/dosis, preferentemente de menos de 75 pg/dosis, más preferentemente de menos de 50 pg/dosis, incluso más preferentemente de menos de 25 pg/dosis, y todavía más preferentemente de menos de 10 pg/dosis, en la que una dosis representa una dosis que comprende la composición inmunógena o de vacuna que se administrará a un sujeto que lo necesite como una dosis única.

Como se detalló anteriormente, además de la provisión de antígenos del virus del Zika adecuados para provocar un anticuerpo o una respuesta inmunitaria contra un epítipo derivado del virus del Zika, la pureza de una composición inmunógena o de vacuna es de gran importancia para proporcionar una composición inmunógena que sea segura para su uso. Sobre la base de los métodos en la presente memoria, una composición inmunógena que comprende por lo menos un antígeno del virus del Zika puede contener menos de 30 ng/ml, preferentemente menos de 20 ng/ml, más preferentemente menos de 10 ng/ml, incluso más preferentemente menos de 1 ng/ml, incluso más preferentemente menos de 100 pg/ml, incluso más preferentemente menos de 10 pg/ml, y todavía más preferentemente menos de 1.1 pg/ml de ADN de célula huésped contaminante por un ml de las partículas de virus quimérico recombinante obtenidas directamente en por lo menos una fracción después de la purificación cromatográfica con respecto a 1 ml de una de por lo menos una fracción. El término obtenido directamente después de la purificación cromatográfica implica el grado de pureza obtenido en la muestra, tal como se obtiene directamente sin etapas adicionales de concentración o filtración, después de recoger el pico del producto de la etapa de cromatografía. Naturalmente, el nivel de ADN de células huésped contaminantes o el nivel de otras impurezas relacionadas con el proceso o producto es aún menor, por lo menos en un factor de 1 a 10, en función de, entre otros, la eficiencia del proceso de producción y el título final seleccionado para la aplicación, y, por lo tanto, el nivel de ADN o proteínas contaminantes u otros materiales en una composición inmunógena o de vacuna es, naturalmente, aún menor. Como se detalló en los Antecedentes de la invención, actualmente, la OMS define un límite de 10 ng/dosis de una composición de vacuna de fármaco que se administrará a un sujeto, mientras que el límite anterior de 100 pg/ml se aumentó al umbral de 10 ng/ml, ya que muchos fabricantes de composiciones de

5 virus, especialmente en el contexto de virus vivos atenuados, tales como el sarampión, las paperas y la rubéola, no podían garantizar sistemáticamente un nivel tan bajo de ADN de células huésped contaminantes. La composición inmunógena o de vacuna tal como se proporciona en la presente memoria y tal como se purificó de acuerdo con los métodos de la presente invención, permite la provisión de una composición de fármaco, que incluso presenta un grado de ADN de célula huésped contaminante de menos de 100 pg/dosis o incluso menor y, todavía más preferentemente incluso por debajo del límite de detección actual para ADN que se puede obtener con los métodos de detección actualmente disponibles, que actualmente se encuentra en el rango de pictograma de un dígito dependiendo del material que se analizará y el método cuantitativo utilizado, incluyendo la PCR; análisis basados en enzimas y en luminiscencia. En el contexto de la presente invención, dado el sistema de detección utilizado en la presente invención, dicho límite de detección para ADN es de 1.1 pg/ml.

15 Los métodos para determinar la concentración de ADN de células huésped contaminantes son conocidos por los expertos en la materia. Dichos métodos avanzan rápidamente y, por lo tanto, el límite de cuantificación (LOQ: cantidad de ADN objetivo que maximiza la suma de sensibilidad y especificidad) y el límite de detección (LOD: la cantidad más baja de ADN objetivo que puede amplificarse con una tasa de falsos negativos debajo de un umbral dado) para una muestra de interés han mejorado rápidamente. Por lo tanto, actualmente es posible una cuantificación mucho más precisa de impurezas/contaminantes relacionados con el proceso y el producto que hace 20 años. Un método estándar para detectar pequeñas cantidades de ADN contaminante en una muestra es la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR o qRT PCR) (por ejemplo, análisis PicoGreen® (Life Technologies)). Otro método para detectar ADN o proteínas contaminantes en una muestra de interés son los ensayos del umbral de ADN (por ejemplo, Ensayo de inmunoligando (ILA) Threshold® o Dispositivos moleculares de ensayo de ADN total Threshold®). Dichos métodos muestran una alta sensibilidad y un buen límite de detección en el rango de pictogramas, y están fácilmente disponibles para los expertos. Asimismo, los métodos para realizar una cuantificación de proteína total o de proteínas específicas contenidas como contaminantes en una muestra o en una composición inmunógena o de vacuna que comprende las partículas de virus infeccioso purificadas que derivan del andamiaje del virus del sarampión se pueden cuantificar mediante métodos fácilmente disponibles para un experto. Dichos métodos, entre otros, incluyen un ensayo de BCA ácido bicinconínico (ácido bicinconínico) o un ensayo ELISA de proteína de célula huésped (HCP) de células Vero (Cygnus Technologies, límite de detección actual según lo declarado por el fabricante: 700 pg/ml) u otros métodos basados en enzimas y/o fluorescencia. Dichos métodos están fácilmente disponibles para un experto.

35 Además, es una ventaja de los métodos de acuerdo con la presente invención y los productos que se pueden obtener de ellos que, en principio, no es necesario un procesamiento o una concentración posterior después de la etapa de cromatografía, lo que es ventajoso, ya que cada etapa adicional sería intrínsecamente propensa a una pérdida del material del virus y tendría que realizarse bajo condiciones de GMP. Además, los métodos de acuerdo con la presente invención y los productos que pueden obtenerse se proporcionan en un alto rendimiento y en forma activa a partir de la etapa de cromatografía, permitiendo, si se desea, una etapa de purificación adicional, por ejemplo, en caso de desear una separación adicional de viriones infecciosos y partículas similares a virus infecciosas, si están presentes, del conjunto de partículas de virus infeccioso purificadas, o una disminución adicional de las impurezas relacionadas con el producto y el proceso, por ejemplo, durante una etapa adicional de purificación, pulido o intercambio de solución amortiguadora.

45 En ciertas formas de realización, por lo menos una secuencia que codifica un antígeno del virus del Zika porta por lo menos una etiqueta que permite una purificación por cromatografía de afinidad como primera etapa de purificación cromatográfica, como una etapa de purificación adicional o con fines analíticos. Un experto conocerá las secuencias de etiquetas adecuadas.

50 Los métodos y medios para cultivar una célula huésped de acuerdo con la presente divulgación que permiten la viabilidad de la célula huésped respectiva y que permiten la introducción, el mantenimiento y la transcripción, la traducción y posiblemente la secreción de los vectores, ácido nucleico y moléculas de aminoácidos descritos en la presente memoria son bien conocidos por los expertos en la materia.

55 Un experto en la materia puede determinar fácilmente las condiciones de reacción adecuadas mencionadas en la presente memoria, que incluyen, entre otras, soluciones amortiguadoras, incluyendo la composición y el pH de la solución amortiguadora, aditivos, condiciones de temperatura y pH, tiempos de reacción y similares, con el conocimiento de la descripción proporcionada en la presente memoria. Dichas condiciones pueden variar naturalmente dependiendo de las células huésped de la población celular elegida para la infección, mientras que la descripción proporcionada en la presente memoria proporciona una guía para establecer y determinar dichas condiciones de reacción.

60 La composición inmunógena de acuerdo con la presente invención habitualmente comprende por lo menos un vehículo y/o excipiente farmacéutica y/o veterinariamente aceptable. En este contexto, una composición inmunógena es cualquier composición que provoque una respuesta inmunitaria en un sujeto.

65 Un vehículo de acuerdo con la presente divulgación es una sustancia que presenta como objetivo mejorar la administración y la eficacia de una composición de fármaco, generalmente sin ser un ingrediente médico. Los



materiales de vehículo pueden depender del estado físico de una composición de fármaco que se administrará. Típicamente, las composiciones inmunógenas o de vacuna se administran como solución líquida. Por lo tanto, particularmente para composiciones inmunógenas que comprenden un virus recombinante o una VLP/RSP, un vehículo implica una solución amortiguadora adecuada, que comprende una composición adecuada, por ejemplo, sales y pH, que son necesarios para estabilizar el virus recombinante o VLP/RSP. Las sustancias adecuadas son bien conocidas por los expertos en la materia e incluyen macromoléculas grandes, lentamente metabolizadas, tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas de virus inactivos. Las sales farmacéutica y veterinariamente aceptables asimismo pueden usarse en la composición inmunológica, por ejemplo, sales minerales, tales como clorhidratos, hidrobromuros, fosfatos o sulfatos, así como las sales de ácidos orgánicos, tales como acetatos, propionatos, malonatos o benzoatos. Las composiciones inmunológicas asimismo pueden contener líquidos, tales como agua, solución salina, glicerol y etanol, así como sustancias tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes o agentes reguladores del pH. Adicionalmente, los nanovehículos, incluyendo los liposomas, asimismo se pueden usar como vehículos. Dependiendo de la naturaleza de por lo menos una composición inmunógena o de vacuna usada y que depende de la respuesta inmunitaria, la cual se prevé provocar, dicha composición puede comprender adicionalmente un adyuvante y otros vehículos farmacéutica y/o veterinariamente aceptables. Además, una composición inmunógena o de vacuna de acuerdo con la presente divulgación puede comprender más de un principio activo en forma de un antígeno. Se conocen numerosas soluciones farmacéuticamente aceptables adicionales para uso en la preparación de vacunas, y pueden adaptarse fácilmente para su uso en la presente invención por los expertos en la materia (ver, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences (18ª edición), ed. A. Gennaro, 1990, Mack Publishing Co., Easton, PA).

Un excipiente es una sustancia incluida en una composición de fármaco, que incluye una composición inmunógena o de vacuna, que se añade para fines de estabilización a largo plazo, agrupando formulaciones sólidas que contienen principios activos, incluyendo, por ejemplo, partículas de virus infecciosos, o para conferir una mejora terapéutica sobre el principio activo en la forma farmacéutica final, por ejemplo, para mejorar la absorción, modificar la viscosidad o mejorar la solubilidad. Los excipientes comunes incluyen, pero no se limitan a, antibióticos añadidos para prevenir el crecimiento de bacterias dentro de los viales de la vacuna durante la producción y el almacenamiento de la vacuna. Por ejemplo, la neomicina y/o la polimixina B pueden usarse en la fabricación de vacunas, tales como la vacuna contra el sarampión, paperas y rubéola. Además, un excipiente asimismo puede ser un estabilizante como el glutamato monosódico ("MSG") y el 2-fenoxietanol, que aumentan la vida útil de la vacuna, es decir, protegen la vacuna del calor, la luz, la acidez o la humedad. Otros excipientes pueden incluir aditivos, incluyendo lactosa, sorbitol y sacarosa, glicina y albúmina sérica humana o bovina (vaca/ternera), y MSG. Además, los conservantes y diluyentes pueden estar comprendidos por una composición inmunógena o de vacuna. Un experto en la materia puede encontrar fácilmente sustancias adecuadas para preparar una composición inmunógena o de vacuna de acuerdo con la presente invención adecuada como excipiente en su sentido más amplio (ver, por ejemplo, Remington, ut supra, o Remington: Remington: The Science and Practice of Pharmacy, ed. 2012). La gelatina, que es colágeno parcialmente hidrolizado, generalmente de origen bovino (vaca) o porcino (cerdo), se añade a algunas vacunas como estabilizador.

Un tratamiento profiláctico tal como se menciona en la presente memoria en el contexto de composiciones de vacuna significa un tratamiento que media una respuesta inmunitaria protectora en un sujeto vacunado para que no haya síntomas o los síntomas sean menos graves, cuando el sujeto, después de haber sido vacunado y después de haber desarrollado una respuesta inmunitaria a la composición de vacuna, se encuentre con una infección con la cepa no atenuada de tipo silvestre de los antígenos de un virus que está presente en la composición de vacuna.

Un tratamiento terapéutico, por ejemplo, implica que las composiciones inmunógenas o de vacuna de acuerdo con la presente invención se usan para generar anticuerpos neutralizantes contra por lo menos un antígeno derivado de un virus del Zika, preferentemente en un animal. Dichos anticuerpos pueden obtenerse y, opcionalmente, purificarse o modificarse, para proporcionar una composición adecuada para tratar una infección persistente por el virus del Zika. Para las estrategias terapéuticas, se pueden usar agentes antivirales adicionales para mejorar la recuperación de un paciente que padece una infección por el virus del Zika. Los agentes antivirales son preferentemente agentes anti-*Flaviviridae* e incluyen, pero no se limitan a, agentes inmunomoduladores, tales como interferones  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\delta$ , compuestos de interferón  $\alpha$  derivatizados y pegilados, y timosina u otros agentes antivirales, tales como ribavirina, amantadina y telbivudina; otros inhibidores de proteasas virales; inhibidores de otros objetivos en el ciclo de vida de *Flaviviridae* (por ejemplo, virus del dengue, virus de la hepatitis C), incluyendo inhibidores de helicasa, polimerasa y metaloproteasa; inhibidores de la entrada interna de ribosomas; inhibidores virales de amplio espectro, tales como inhibidores de IMPDH, o combinaciones de cualquiera de los anteriores.

En una forma de realización, la composición inmunógena o la composición de vacuna para uso en un método para prevenir o tratar una enfermedad del virus del Zika de acuerdo con la presente divulgación no únicamente protegerá a un sujeto que haya sido tratado con dicha composición inmunógena o dicha composición de vacuna, sino que asimismo presenta la capacidad de prevenir una enfermedad del virus del Zika en un feto no nacido de una mujer embarazada que ha sido tratada con dicha composición inmunógena o dicha composición de vacuna para evitar las duras y graves consecuencias de la infección por el virus del Zika durante el embarazo y proteger al feto inmunizando a la madre del no nacido con las composiciones inmunógenas o composiciones de vacuna de acuerdo

con la presente invención. Lo anterior es de vital importancia, ya que se ha demostrado que el virus del Zika puede pasar de una mujer embarazada infectada a su feto.

De acuerdo con la presente divulgación, las vacunas y/o formulaciones inmunógenas de la presente descripción pueden administrarse en un programa de dosificación, por ejemplo, una administración inicial de la composición de vacuna con administraciones de refuerzo subsiguientes. En unas formas de realización particulares, una segunda dosis de la composición se administra en cualquier período de dos semanas a un año, preferentemente de aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5 a aproximadamente 6 meses, después de la administración inicial. Además, puede administrarse una tercera dosis después de la segunda dosis y de aproximadamente tres meses a aproximadamente dos años, o incluso más, después de la administración inicial, preferentemente aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, o aproximadamente 7 meses a aproximadamente un año después de la administración inicial. Una tercera dosis puede administrarse opcionalmente cuando no se detectan niveles o se detectan niveles bajos de inmunoglobulinas específicas en el suero y/o en la orina o en las secreciones de la mucosa del sujeto después de la segunda dosis. En otra forma de realización, las composiciones de la presente divulgación se pueden administrar como parte de una terapia de combinación. Para composiciones de vacuna de acuerdo con la presente invención basadas en un andamiaje del vector del virus del sarampión, una sola administración o una administración seguida de una inyección de refuerzo usualmente serán suficientes para establecer una respuesta inmunitaria protectora incluso en presencia de una inmunidad antivector preexistente contra el andamiaje del virus del sarampión. Para inmunizaciones activas usadas para tratar una enfermedad por el virus del Zika, los regímenes de dosificación pueden variar, pero pueden determinarse basándose en análisis biomédicos antes de aplicar una composición para uso en el tratamiento de una infección por el virus del Zika a un sujeto que lo necesita.

La presente invención se describe adicionalmente haciendo referencia a los siguientes ejemplos.

## Ejemplos

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

### Ejemplo 1: diseño del antígeno del virus del Zika

El antígeno inmunodominante de los flavivirus es la proteína E. Los anticuerpos neutralizantes que se desencadenan por una infección flaviviral se generan contra esta proteína, tal como se destaca en Pierson TC et al., 2008. No se sabe mucho sobre la proteína E del virus del Zika. No obstante, se cree que podría exhibir las mismas características que las de otros Flavivirus, tales como TBEV, WNV o dengue. Por lo tanto, los antígenos del virus del Zika subyacentes al presente trabajo se diseñaron para comprender la proteína E completa o una forma soluble truncada de la proteína E que carece de la región de tallo-anclaje que se describe en Stiasny et al., 2013. Los grupos de investigación que trabajan en flavivirus han demostrado que la proteína E soluble puede provocar anticuerpos neutralizantes en diversos modelos animales. Zlatkovic et al., 2011, demostraron lo anterior para las proteínas sE de TBEV y WNV en ratones, Clements et al., 2010, para las cuatro sE del dengue en ratones y monos, y Deprès et al., 2005, para la sE del WNV. A diferencia de la proteína sE del grupo alrededor de Deprès que todavía contenía algunas partes de la región de tallo-anclaje, en todas las demás proteínas sE se había eliminado la región de tallo-anclaje completa. Para evaluar si estos hallazgos asimismo podrían verificarse para el antígeno sE del Zika, se diseñó y analizó más a fondo una variante que asimismo carece de toda la región de tallo-anclaje de acuerdo con las proteínas sE de Zlatkovic et al. o Clements et al. Además, se realizó un análisis exhaustivo de todos los genomas del virus del Zika actualmente disponibles.

Además de la proteína E, asimismo se añadió la secuencia de codificación de la proteína prM completa al antígeno del virus del Zika para obtener una expresión de proteína óptima. Lo anterior fue conforme a los estudios realizados por Zlatkovic et al. y Clements et al. Por el contrario, Deprès et al. generaron construcciones de virus del sarampión que expresan únicamente una proteína sE del WNV junto con el extremo C-terminal de la proteína prM mediante el cual se codificó la secuencia de translocación de E. De acuerdo con la hipótesis de que la proteína prM facilita el plegamiento adecuado de la proteína E, la adición de la secuencia de prM completa apoyaría una expresión óptima de la proteína E en las células objetivo y, por lo tanto, se realizó para el diseño de sE del Zika.

Durante una infección, los flavivirus asimismo pueden producir partículas subvirales que son más pequeñas que los viriones y están compuestas de prM o M y E. Estas partículas generalmente se llaman partículas subvirales recombinantes o RSP. Allison et al., 1995 demostraron que, para TBEV, las partículas subvirales recombinantes se pueden formar coexpresando prM y la proteína E completa. Otros grupos de investigación asimismo han confirmado la formación de estas partículas subvirales recombinantes para otros Flavivirus y han utilizado esta característica única de prM y E para el desarrollo de vacunas (Konishi et al., 2001 para el VEJ, Konishi y Fujii, 2002 para el dengue, Davis et al., 2001 para el WNV, y Wang et al., 2009 para el dengue). Para diseñar el antígeno de RSP del Zika, asimismo se usaron las secuencias completas de proteína prM y E para obtener partículas subvirales recombinantes del Zika. Además, se introdujo una mutación (Leu107Asp) en la proteína E de RSP del Zika en la posición 107. Allison et al., 2001 demostraron que la mutación de Leucina 107 a ácido aspártico suprime la fusión de partículas subvirales recombinantes de TBEV con la membrana objetivo, pero no interfiere en la formación de

partículas. Leu107 se encuentra además en un motivo altamente conservado que es común entre todos los Flavivirus y, por lo tanto, asimismo es probable que esté presente en la proteína E de las secuencias derivadas del virus del Zika.

5 Además, dos residuos básicos Arg-Arg situados frente a la secuencia de señal de prM del virus del Zika se añadieron al antígeno de sE y RSP del Zika. En el contexto de la poliproteína de Flavivirus, estos aminoácidos forman junto con el siguiente pequeño aminoácido no ramificado el sitio de escisión de la cápside de la proteasa NS2B/3 viral en la región C-terminal de la proteína de la cápside. Solamente después de la escisión en este sitio, se libera la proteína de la cápside, la secuencia de señal de prM se mueve hacia la luz del RE, la secuencia de  
10 señal obtiene acceso a su sitio de escisión y puede generarse el extremo N-terminal de la proteína prM. Debido al hecho de que los antígenos diseñados del virus del Zika no codifican la secuencia para la proteína de la cápside completa, no se supone que haya ninguna interferencia con la formación de la proteína prM, sin embargo, se cree que la adición de los residuos básicos respalda la posición correcta de la secuencia de señal de prM en la membrana del RE y, por lo tanto, asimismo una mejor expresión del antígeno, que es un requisito previo importante  
15 para el desarrollo de composiciones inmunógenas y de vacuna activas.

Además, asimismo se añadió una secuencia de Kozak (ver, por ejemplo, SEC ID N°.: 154 o 155) frente a la secuencia del virus del Zika con el fin de obtener una traducción de proteínas óptima en las células objetivo. Después del codón de inicio dentro de la secuencia de Kozak, se introdujo una inserción de gca adicional que  
20 codifica una alanina para obtener una secuencia de Kozak óptima para los vertebrados con una "g" después del codón de inicio. Con el fin de evitar la ultralectura durante la traducción de proteínas, se añadió más de un codón de terminación al final de los antígenos del virus del Zika. Se añadieron dos o tres codones de terminación para obedecer la regla de seis respectivamente. Esta regla de seis es especialmente importante si el ARN derivado del virus del sarampión se utiliza como una estructura principal del vector, ya que de lo contrario no se iniciaría la  
25 replicación. Si se trabaja con otras estructuras principales de vectores, se deben considerar otros parámetros de diseño.

### Ejemplo 2: optimización de codones, mutagénesis y construcción de vectores

30 Tal como se detalló anteriormente, ciertos candidatos de antígeno del virus del Zika se sometieron a optimización de codones como se muestra, por ejemplo, para inserciones de acuerdo con SEC ID N°.: 53 y 54 (sE+prM del virus del Zika y RSP+prM del virus del Zika, respectivamente), antes de la optimización de codones en comparación con SEC ID N°.: 55 y 56 (sE+prM del virus del Zika y RSP+prM del virus del Zika, respectivamente), después de la optimización de codones para el uso de codones humanos. La optimización de codones para adaptar el uso de  
35 codones de las secuencias de ácidos nucleicos deseadas a un uso de codones humanos fue llevada a cabo por Eurofins Genomic. La mutagénesis para analizar la función de la posición L107 en los diversos serotipos del virus del Zika analizados se realizó utilizando un kit de mutagénesis dirigida al sitio QuickChange II (Agilent). La clonación de inserciones sintetizadas de virus del Zika (síntesis: Eurofins Genomics) en una estructura principal del vector recombinante se llevó a cabo utilizando técnicas estándar de biología molecular. Preferentemente, las inserciones se clonaron en la estructura principal del vector de acuerdo con SEC ID N°.: 60 o una estructura principal del vector comparable derivada de una cepa Schwarz del virus del sarampión en la región ATU2 usando las enzimas de restricción *Bsi*MI y *Bss*HII.

### Ejemplo 3: infección y banco celular maestro (MCB)

45 Para los fines de este ejemplo, un virus quimérico recombinante, atenuado y vivo que expresa el antígeno del virus del Zika, (ver SEC ID N°.: 57 que comprende una inserción de sE del MV del Zika, optimización de codones humanos y SEC ID N°.: 58 que comprende un inserto de RSP del MV del Zika, optimización de codones humanos) que se generó al transfectar células auxiliares con el vector, en el que dichas células auxiliares son capaces de  
50 expresar funciones auxiliares para expresar una ARN polimerasa, y para expresar las proteínas N, P y L de un virus MV; 2) cocultivar dichas células auxiliares transfectadas de la etapa 1) con células pasadas adecuadas para la etapa de la cepa atenuada de MV de la cual se origina el ADNc; 3) recuperar el virus infeccioso recombinante que expresa por lo menos una proteína estructural de un virus del Zika para proporcionar una solución madre de cultivo de siembra del virus (MVSS) (ver la descripción del documento WO 2014/049094 A1). Las células Vero 10-  
55 87 actuaron como células huésped y como banco celular maestro (MCB). La MVSS utilizada para este esquema de purificación ejemplificativa puede obtenerse a partir de la secuencia de acuerdo con SEC ID N°.: 57 y 58 de acuerdo con la presente solicitud, o se puede clonar un vector adecuado por medio de biología molecular de rutina, sobre la base de la información proporcionada en la presente memoria, en un plásmido depositado bajo el Tratado de Budapest en el Instituto Leibniz DSMZ - Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares GmbH (DSMZ) (Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig, Alemania) con el número de acceso DSM 32235 (pTM 2ATU MV CHIK) y DSM 32234 (pTM 2ATU MV DVAX1), respectivamente, para los fines del documento EP15202480.8 cuya prioridad reivindica esta solicitud. De este modo, se hace referencia específica a este material depositado por el mismo solicitante a los efectos de la solicitud de fundación de prioridad EP15202480.8. El material se depositó  
60 como ADN plásmido. Se indicó que *Escherichia coli* era un huésped adecuado para la transformación y propagación de los respectivos plásmidos. Tanto el depósito DSM 32235 como el DSM 32234 se depositaron el 15 de diciembre de 2015, y DSMZ confirmó la viabilidad en una declaración de viabilidad conforme a la norma 10.2

del Tratado de Budapest el 16 de diciembre de 2015. Tanto DSM 32234 como DSM 32235 comprenden un sitio de ER NotI (del vector de clonación), una secuencia del promotor T7 y del terminador T7, 5': ribozima de cabeza de martillo; 3': secuencia de ribozimas de hepatitis delta, una secuencia derivada del virus del sarampión, una secuencia del promotor/terminador del sarampión, una inserción de dengue (DSM 32234) o Chikungunya (DSM 32235) clonada en los sitios de restricción *Bsi*MI y *Bss*HII; y una secuencia de vector de clonación (el plásmido deriva originalmente de pBluescript). Un gen de resistencia a la ampicilina para la selección está presente. Los sitios de restricción *Bsi*MI y *Bss*HII se pueden usar para la clonación de secuencias de codificación de antígenos del virus del Zika de la presente invención.

Como se detalló anteriormente para el Ejemplo 2, los antígenos de Zika relevantes tal como se divulgan en la presente memoria pueden clonarse en una estructura principal del vector de interés adecuada para fines de vacunación mediante la clonación de la endonucleasa de restricción apropiada, tal como se detalló anteriormente, como se detalla a continuación para el Ejemplo 16, o sobre la base de la información disponible de fabricantes/proveedores de estructuras principales de vectores adecuadas.

#### **Ejemplo 4: reactivación y expansión del MCB en condiciones de GMP**

Dos crioviales que contenían cada uno 1.0 ml de MCB se retiraron del almacenamiento en nitrógeno líquido en fase de vapor y se transportaron a la sala blanca en un recipiente desinfectado que a su vez se transporta en hielo seco. Una vez dentro de la sala blanca, los crioviales de MCB se descongelaron manualmente/a temperatura ambiente mientras se agitaba suavemente el contenido hasta que todo el hielo dentro de los viales se había derretido. Una vez que los viales se habían descongelado, se transfirieron a un gabinete de bioseguridad. Las suspensiones celulares descongeladas de cada vial se transfirieron asépticamente a tubos de centrifuga de 50 ml. Se añadieron gota a gota 9 ml de medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) previamente precalentado + suero bovino fetal (FBS) al 10% a cada tubo de 50 ml que contenía las células descongeladas mientras se agitaban suavemente los tubos. Los crioviales MCB/ WCB se enjuagaron cada uno con la suspensión celular homogénea del tubo de centrifuga, y el enjuague se transfirió de vuelta a los respectivos tubos de 50 ml.

A continuación, las suspensiones celulares se centrifugaron a  $300 \times g \pm 5\%$  durante 5 minutos a temperatura ambiente. Los sobrenadantes se eliminaron y los sedimentos se suspendieron en 10 ml de medio DMEM + FBS al 10%. Los sedimentos resuspendidos se retiraron del gabinete de bioseguridad y se centrifugaron por segunda vez usando los mismos parámetros que anteriormente. El sobrenadante se descartó nuevamente y los sedimentos se resuspendieron en 10 ml de medio DMEM + FBS al 10%. Se eliminaron 0.5 ml de las suspensiones celulares preparadas y se usaron para realizar un recuento celular para determinar las células viables y la viabilidad. Las suspensiones celulares restantes se pasaron a un matraz/suspensión de cultivo de células T225 y el medio se completó hasta los 50 ml usando medio DMEM + FBS al 10%. Después del crecimiento en el cultivo en matraz, el sobrenadante de los matraces 2xT225 se retiró, se eliminó y la monocapa celular se lavó con D-PBS precalentada. Se añadió la enzima TrypLE Select precalentada a cada matraz y se distribuyó uniformemente sobre la monocapa. Los matraces se incubaron para separar las células y posteriormente se observaron para el desprendimiento de las células bajo el microscopio. De ser necesario, los matraces se golpearon suavemente para separar las células. Si el desprendimiento estaba por debajo del 90%, los matraces se incubaron adicionalmente hasta que se alcanzó un desprendimiento superior al 90%.

Se añadió medio DMEM + FBS al 10% precalentado a cada matraz y la suspensión celular se retiró a tubos de centrifuga estériles. Después de la centrifugación, el sobrenadante se retiró y se eliminó mientras que los sedimentos celulares se resuspendieron en medio DMEM + FBS al 10% pipeteando hacia arriba y hacia abajo. Los cultivos se suspendieron por completo si no se observaron cúmulos de células. Las soluciones celulares resuspendidas de matraces 2xT225 se transfirieron cada una a recipientes estériles (tubo de centrifugación de 50 ml) y se mezclaron para obtener una solución de células homogénea. Se eliminaron 0.5 ml de las suspensiones celulares preparadas y se usaron para realizar un recuento celular para determinar las células viables y la viabilidad de cada solución celular. Las suspensiones celulares restantes se pasaron a un matraz/suspensión de cultivo de células 5xT225 y el medio se completó hasta los 50 ml usando medio DMEM + FBS al 10%. De este modo, en total se prepararon 10xT225 matraces en esta configuración ejemplificativa, que naturalmente podría depender de la naturaleza del producto que se producirá.

Después de la etapa 2 del crecimiento en el cultivo en matraz, el sobrenadante de los dos matraces T225 se retiró, se eliminó y la monocapa celular se lavó con D-PBS precalentada. A continuación, se añadió la enzima TrypLE Select precalentada a cada matraz y se distribuyó uniformemente sobre la monocapa. Los matraces se incubaron para separar las células y posteriormente se observaron para el desprendimiento de las células bajo el microscopio. De ser necesario, los matraces se golpearon suavemente para separar las células. Si el desprendimiento estaba por debajo del 90%, los matraces se incubaron adicionalmente hasta que se alcanzó un desprendimiento superior al 90%. Los parámetros se describen en la tabla 1 a continuación.

Se añadió medio DMEM + FBS al 10% precalentado a cada matraz y las suspensiones celulares se retiraron a tubos de centrifuga estériles. A continuación, las suspensiones celulares se centrifugaron tal como se describe en la tabla 3 a continuación. Después de la centrifugación, el sobrenadante se retiró y se eliminó mientras que los

sedimentos celulares se resuspendieron en medio DMEM + FBS al 10% pipeteando hacia arriba y hacia abajo. Los cultivos se suspendieron por completo si no se observaron cúmulos de células. Las soluciones celulares resuspendidas de cada conjunto (matraces 5xT225) se transfirieron/agruparon en un recipiente estéril (tubo de centrifugación de 50 ml) y se mezclaron para obtener una solución de células homogénea. Se eliminaron 0.5 ml de las suspensiones celulares preparadas y se usaron para realizar un recuento celular para determinar las células viables y la viabilidad de cada solución celular. Después del análisis de las células viables y la viabilidad, se seleccionó el conjunto de matraces T225 de mejor rendimiento y se pasaron a matraces de cultivo celular 30xT225, y se preparó medio de 50 ml usando el medio DMEM + FBS al 10% precalentado.

Tabla 1 Parámetros de cultivo en matraz: etapa 3

Etapa	Parámetro	Criterios de operación (intervalo)
Etapa 3 del cultivo celular	Densidad de siembra	2.00 x 10 <sup>4</sup> células/cm <sup>2</sup>
	Volumen de cultivo (T225)	50 ml
	Medios de cultivo	DMEM + FBS al 10%
	Temperatura de incubación	36.5 ± 1°C
	Duración	Aproximadamente 4 ± 1 días
	CO <sub>2</sub>	5.0% ± 2%
	Humedad	80% ± 10%
	Densidad celular final	≥80% de células confluentes
	Viabilidad celular final	≥80% de viabilidad
Recolección celular	Volumen de lavado de células con PBS (T225)	10 ml
	Volumen de TrypLE Select (T225)	5 ml
	Temperatura de incubación del desprendimiento celular	Temperatura ambiente
	Tiempo de incubación del desprendimiento celular	5 min, posteriormente hasta el 90% de desprendimiento
	Adición de DMEM + FBS al 10% para centrifugación	10 ml
	Centrifugación (g)	300 x g ± 5%
	Tiempo de centrifugación	5 minutos
	Temperatura de centrifugación	Temperatura ambiente
	Volumen de medios de resuspensión de sedimento (DMEM + FBS al 10%)	10 ml

Después del crecimiento en el cultivo en matraz (etapa 3), el sobrenadante de los matraces 30xT225 se retiró, se eliminó y la monocapa celular se lavó con D-PBS precalentada. Se añadió la enzima TrypLE Select precalentada a cada matraz y se distribuyó uniformemente sobre la monocapa. Los matraces se incubaron para separar las células y se observaron para el desprendimiento de las células bajo el microscopio. De ser necesario, los matraces se golpearon suavemente para separar las células. Si el desprendimiento estaba por debajo del 90%, los matraces se incubaron adicionalmente hasta que se alcanzó un desprendimiento superior al 90%.

Se añadió medio DMEM + FBS al 10% precalentado a cada matraz y la suspensión celular se retiró a tubos de centrifuga estériles. La suspensión celular se centrifugó a continuación. Después de la centrifugación, el sobrenadante se retiró y se eliminó mientras que el sedimento celular se resuspendió en medio DMEM + FBS al 10% pipeteando hacia arriba y hacia abajo. El cultivo se suspendió por completo si no se observaron cúmulos de células. Las soluciones celulares resuspendidas de todos los matraces 30xT225 se transfirieron a un recipiente estéril y se mezclaron para obtener una solución de células homogénea. Se eliminaron 0.5 ml de la suspensión celular preparada y se usaron para realizar un recuento celular para determinar las células viables y la viabilidad.

**Ejemplo 5: matraces Spinner y cultivo asistido por microvehículo biorreactor (etapa 4)**

Por cada matraz Spinner de 1 L, se resuspendieron 10 g de microvehículo HillexII en 200 ml de agua para inyección (WFI) y se sometieron a autoclave bajo vapor saturado durante 20 minutos a 2 bar y 121°C. Se puede seleccionar cualquier microvehículo adecuado como material de vehículo de una célula huésped de interés para fines del cultivo asistido por microvehículo. Después de la esterilización, el microvehículo se dejó sedimentar, el WFI se retiró cuidadosamente, se eliminó y el microvehículo se lavó con 200 ml de PBS. Finalmente, la PBS se reemplazó por 100 ml de medio DMEM + FCS al 10% precalentado sin rojo de fenol. El medio con rojo de fenol asimismo se puede usar para esta etapa. A continuación, el microvehículo esterilizado se transfirió al matraz Spinner respectivo de 1 L pipeteando cuidadosamente la suspensión de medio/microvehículo.

La cantidad requerida de células se transfirió asépticamente a cada matraz Spinner. El medio se preparó hasta 500 ml usando medio DMEM + FBS al 10% sin rojo fenol. En total, se prepararon 6 matraces Spinner y se transfirieron a la incubadora, que contenía placas agitadoras magnéticas; la agitación se estableció a 35 rpm. Los matraces centrifugados sembrados se incubaron durante la noche y el medio se completó hasta 1 L usando medio

DMEM + FBS al 10% sin rojo fenol al día siguiente. A continuación, los matraces Spinner se extrajeron de la incubadora y se transfirieron a un gabinete de bioseguridad. Los matraces Spinner se dejaron reposar durante 5 minutos sin agitación para permitir que el microvehículo que contenía las células se sedimentara. El sobrenadante de cada matraz Spinner se retiró cuidadosamente, se eliminó y los microvehículos se lavaron con D-PBS precalentada. Las suspensiones celulares/de microvehículos de cada matraz Spinner se transfirieron posteriormente a un recipiente estéril (500 ml) y se lavaron dos veces con D-PBS. Se añadió la enzima TrypLE Select precalentada al recipiente y se mezcló suavemente para obtener una solución homogénea. Los microvehículos se incubaron para separar las células y la separación celular se controló bajo el microscopio. Cuando se alcanzó un desprendimiento celular superior al 90%, se añadió medio DMEM + FBS al 10% precalentado sin rojo de fenol y se llevó a cabo un recuento de células viables, así como la determinación de la viabilidad.

Por cada biorreactor de 10 L, se resuspendieron 100 g de microvehículo HillexII en 2000 ml de WFI y se sometieron a autoclave bajo vapor saturado durante 20 minutos a 2 bar y 121°C. Después de la esterilización, el microvehículo se dejó sedimentar, el WFI se retiró cuidadosamente, se eliminó y los microvehículos se lavaron con 2000 ml de PBS. A continuación, los microvehículos esterilizados se transfirieron al respectivo biorreactor de 10 L bombeando cuidadosamente la suspensión de PBS/microvehículo usando una bomba peristáltica. Alternativamente, la preparación del microvehículo se puede realizar junto con el proceso de esterilización del recipiente de vidrio del biorreactor: llenar el biorreactor con 100 g de HillexII y añadir 20 ml de WFI/g de HillexII. Lavar 1 x con 20 ml de WFI/g de HillexII fresco y 1 x con 20 ml de PBS/g de HillexII. Cuando el biorreactor esté completamente ensamblado, se realizará una prueba de presión para verificar si el biorreactor está cerrado. A continuación, se someterá a autoclave durante 20 minutos a >121°C. Cuando el biorreactor se haya esterilizado y conectado a la unidad de control, se conectarán todas las sondas (oxígeno disuelto (OD), temperatura y pH), la cubierta calefactora, el agitador y un tubo de muestra adicional para extraer el medio por encima de los microvehículos asentados del biorreactor. Cuando los ajustes se estabilizaron durante aproximadamente 6 horas, se inició el flujo de aire sobre el rociador con una agitación de 75 rpm, y se inició un valor determinado de la temperatura de 37°C. Cuando las señales de la sonda fueron estables, se realizó una calibración de OD al 100%. Después del flujo de aire de la calibración de OD, se detuvo el calentamiento y la agitación, y se permitió que los microvehículos se asentaran en el fondo del biorreactor. El sobrenadante sobre los vehículos asentados se retiró utilizando el tubo de muestra adicional instalado. El biorreactor se llenó con 2.2 litros de medio sin rojo de fenol (2 litros de medio + FBS al 10%). Finalmente, se inició la agitación a 75 rpm, la superposición de flujo de aire de 0.25 L/min, y el calentamiento a 36.5°C. Se tomó una muestra para volver a calibrar el pH mediante la medición fuera de línea. El biorreactor estaba entonces preparado para la inoculación con células.

La cantidad requerida de células (como una suspensión con el microvehículo separado de la etapa anterior) se transfirió asépticamente al reactor que contenía 100 g de microvehículo y 2.2 L de medio DMEM + FBS al 10% precalentado sin rojo de fenol. En general, el contenido completo de dos matraces Spinner de 1 L se transfirió a un biorreactor de 10 L. Esto representa una densidad de siembra de 4 a 5 x 10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup> y una proporción de división de 1:5. Estos parámetros, naturalmente, pueden variar en función de la célula huésped y la MVSS elegida para cada configuración. Después de la transferencia de células, el medio se llenó hasta un volumen de trabajo de 10 L y se inició el control de pH (CO<sub>2</sub> y bicarbonato de sodio) y el control de OD (burbujeo de O<sub>2</sub>). Se tomaron muestras regularmente para observación microscópica y recuentos celulares.

#### **Ejemplo 6: infección de cultivo celular**

Aproximadamente 5 ml de la suspensión celular/de microvehículos dentro del biorreactor se eliminaron para determinar la confluencia del microvehículo y se realizó un recuento de células viables. Las células deben ser ≥80% viables y los microvehículos ≥80% confluentes. El recuento celular se usó para determinar el número de partículas virales requeridas para infectar el cultivo a una MOI de TCID<sub>50</sub> de 0.01/célula. Esta MOI puede variar de nuevo en función de la célula huésped y de la MVSS elegida, pero puede determinarse fácilmente después de las pruebas previas estándar con la célula huésped respectiva y el virus respectivo. Las MOI entre 0.0001 y 0.1 son preferidas. Particularmente, el intervalo de tiempo para la recolección cambiará dependiendo de la MOI seleccionada, que puede ser determinada por el experto. Después de calcular la cantidad de virus requerida, se retiró una cantidad adecuada de viales virales del almacenamiento a -80°C y se transportaron a la sala blanca. Los viales de virus se descongelaron a temperatura ambiente/manualmente hasta que todo el hielo se derritió. Se calculó el volumen de virus requerido para infectar la suspensión de 10 L a una MOI de TCID<sub>50</sub> de 0.01/célula, y se diluyó en 5000 ml de VP-SFM sin rojo de fenol.

La agitación del biorreactor, el control del pH y OD se detuvieron y la suspensión de microvehículos/celular dentro del biorreactor se dejó reposar durante 10 minutos sin agitación para permitir que el microvehículo que contenía células se sedimentara. El medio gastado se retiró cuidadosamente, se eliminó y el microvehículo se lavó dos veces con 2500 ml de D-PBS precalentada. Se añadieron 3000 ml de VP-SFM sin rojo de fenol, se incubaron durante 5 minutos a 36.5 ± 1°C/50 rpm, se retiraron cuidadosamente y se eliminaron. La suspensión viral preparada previamente se añadió posteriormente al biorreactor y se dejó incubar durante 4 a 6 horas a 32.0°C ± 4°C, preferentemente a 32°C ± 1°C, pH a 7.2 ± 0.2, OD >40% y 75 rpm. Después de un período de adsorción viral de 4-6 horas, el medio se llenó hasta 10 L usando VP-SFM sin rojo de fenol.

La suspensión celular/de microvehículos infectada se observó diariamente desde el cuarto día de prorrogación viral hasta que se observó  $\geq 80\%$  de efecto citopático.

5 Las pruebas se llevaron a cabo tras la infección viral, tal como se describe en la tabla 2 a continuación.

Tabla 2 Pruebas durante la propagación viral

Etapa de muestra	Pruebas	Criterios de aceptación
Propagación viral	Observación macroscópica y microscópica	Células cuboidales adherentes
	Color de los medios	Medios de color rojo/naranja
	Evidencia de contaminación	Sin evidencia de contaminación

10 **Ejemplo 7: tratamiento con benzonasa**

Adicionalmente, los protocolos divulgados en la presente memoria pueden comprender una etapa de tratamiento con ADNasa. Este tratamiento puede realizarse antes o después de clarificar la suspensión de virus dependiendo de la célula huésped y la partícula de virus infeccioso recombinante que se purificará. Una ADNasa preferida es una benzonasa, pero cualquier ADNasa adecuada que tenga una actividad, especificidad y pureza comparables se puede elegir para este fin, mientras que la elección de una ADNasa adecuada puede hacerla fácilmente un experto en la materia.

20 A continuación, se detuvo la agitación, el control del pH y OD, y la suspensión celular/de microvehículos dentro del biorreactor se dejó reposar durante 10 minutos sin agitación para permitir que el microvehículo que contenía células se sedimentara. El sobrenadante que contenía virus se transfirió cuidadosamente desde el biorreactor a una bolsa Flexboy estéril de 50 L utilizando la línea de transferencia aséptica por presión y/o gravedad.

25 Se calculó la cantidad requerida de benzonasa y cloruro de magnesio (el cofactor, la concentración y la solución requerida pueden variar en función de la ADNasa elegida para el análisis) para obtener concentraciones finales de 50 u/ml y 2 mM. La benzonasa se retiró del almacenamiento a  $-20^{\circ}\text{C}$ , se transportó a la sala limpia en hielo seco y se descongeló a temperatura ambiente. Dentro del gabinete de bioseguridad, se preparó una solución madre de solución de cloruro de magnesio 200 mM a partir de cloruro de magnesio 1 M usando WFI como diluyente. Antes de la adición, los volúmenes calculados de cloruro de magnesio y benzonasa se mezclaron en una solución homogénea, y posteriormente se añadieron a la suspensión viral y se agitaron suavemente. Se añadieron cloruro de magnesio y benzonasa de manera que la concentración final de benzonasa dentro de la solución fue de 50 u/ml y la concentración final de cloruro de magnesio fue de 2 mM. La bolsa de 50 L se colocó en un agitador orbital dentro de una incubadora y se incubó a  $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante una hora con agitación suave. Los parámetros pueden variar en función de la ADNasa utilizada, pero pueden ser adaptados fácilmente por un experto en la materia con el conocimiento de la presente descripción. Los cuatro matraces Spinner de 3 L que contenían la suspensión de virus tratada con benzonasa se transfirieron directamente a la parte posterior (procesamiento en un día) o se almacenaron a  $4^{\circ}\text{C}$  durante la noche (procesamiento en dos días). Se debe evitar almacenar el grupo tratado con benzonasa durante más de una noche.

40 **Ejemplo 8: especificación a granel sin purificar**

Después de la recolección/tratamiento con benzonasa, el material se analizó. De acuerdo con la especificación a granel sin purificar, tal como se muestra en la tabla 3 a continuación. Los kits y métodos para llevar a cabo dicho análisis están fácilmente disponibles para un experto.

45 Tabla 3 Especificación a granel sin purificar

Pureza	Micoplasma EP 2.6.7	Negativo
	Agentes adventicios <i>in vitro</i>	Negativo
	Agentes adventicios <i>in vivo</i>	Negativo

**Ejemplo 9: fabricación posterior - clarificación**

50 Para la clarificación de la suspensión de virus opcionalmente tratada con benzonasa, se usaron unidades de filtración de profundidad Sartorius Sartopure PP3. Dos filtros se conectan en paralelo para permitir un cambio entre los filtros en caso de un aumento de presión. Primero, ambos filtros se lavaron con PBS estéril y se realizó una prueba de caída de presión a 20 psi durante 5 minutos. La recolección tratada con benzonasa se conectó a los tubos de entrada de los filtros de clarificación, mientras que la entrada del filtro 1 estaba abierta y la entrada y salida del filtro 2 estaban cerradas. El material tratado con benzonasa se clarificó mediante filtración a través del filtro 1 usando una presión máxima de 20 psi. La velocidad de la bomba puede ajustarse para mantener la presión por debajo de 20 psi si es necesario. En caso de que la presión alcance los 20 psi antes de que se filtre la recolección completa, se debe cambiar al filtro de derivación (filtro 2). Una vez que se haya filtrado la recolección

completa, los filtros 1 (y 2) se vaciaron bombeando aire a los trenes de filtrado. El material de virus clarificado se sometió directamente a purificación.

5 El método de clarificación seleccionado aquí puede variar en función del material que se debe clarificar y se puede aplicar cualquier método de filtración adecuado. Es importante considerar la gran superficie polimórfica del virus del sarampión, que representa la estructura del andamiaje que debe clarificarse. Por lo tanto, se deben elegir materiales de filtro adecuados, que no muestren una unión inespecífica de la preparación basada en el andamiaje del virus del sarampión, lo que daría como resultado una pérdida de rendimiento o funcionalidad. Como se detalló anteriormente, se debe evitar la centrifugación debido a la escalabilidad limitada de la misma bajo condiciones de GMP y/o el riesgo de contaminaciones.

### Ejemplo 10: purificación basada en cromatografía en columna

#### Preparación de la columna CIM®-OH

15 La columna monolítica CIM®-OH de 1 x 80 ml (Bia Separations) con un tamaño de poro de 6 µm se retiró del almacenamiento a 2-8°C y se dejó calentar durante ≥2 horas antes de su uso. Se puede usar cualquier otra columna adecuada para la purificación, siempre que permita la retención específica de la suspensión de virus basada en el andamiaje del virus del sarampión que comprende partículas de virus infeccioso recombinante en las dimensiones respectivas y con las propiedades químicas respectivas de su estructura superficial. Preferentemente, se debe elegir un tamaño de poro de por lo menos 4 µm, preferentemente más, para evitar la obstrucción de la columna y la unión inespecífica debido a las dimensiones de la preparación de virus derivada del virus del sarampión que se debe purificar. Se puede usar cualquier columna basada en la interacción hidrófoba, afinidad, exclusión por tamaño o intercambio iónico como principio de separación dependiendo de la naturaleza de la inserción, que puede, por ejemplo, comprender una etiqueta de afinidad en una región de codificación de proteína o que puede tener características específicas para aplicar una cromatografía de intercambio iónico. Un procedimiento ejemplificativo que utiliza un sistema de cromatografía ÄKTA Pilot se configura tal como se describe a continuación. Se puede elegir cualquier sistema de cromatografía adecuado en el contexto de la presente invención siempre que sea compatible con la columna elegida.

30 El electrodo de pH se calibró de acuerdo con los respectivos procedimientos normalizados de operación. Los tubos de entrada se conectaron a las entradas del sistema ÄKTA Pilot A1, A2, B1, B2, B3 y a las entradas de muestra S1 y S2, y se sujetaron con bridas. Usando un dispositivo conectivo estéril ("SCD"), se conectó una pieza en dos T al tubo de entrada en S1 para crear una derivación en esta línea. Usando el SCD, el tubo de limpieza se conectó al tubo de entrada en A1, A2, B1, B2, B3, S2 y ambas líneas de la pieza en T en S1. La tubería de salida se conectó a las salidas F1, F3, F5 y F7 del sistema ÄKTA Pilot y cada conexión se sujetó con bridas. Las ventilaciones se sujetaron con abrazaderas Kocher en los tubos de salida. Usando el SCD, se conectó un conjunto de tubos de salida de limpieza a los tubos de salida en F1, F3, F5 y F7, y a una bolsa de desechos de 20 L. La columna monolítica CIM®-OH se conectó en dirección ascendente a la posición 2 de la columna. La segunda columna se colocó en la posición 3 de la columna. Usando el SCD, se conectó la solución de NaOH 1.0 M (> 6.5 L/columna) al tubo de limpieza de entrada. Todas las entradas, salidas y el sistema se enjuagaron con NaOH 1.0 M. Las columnas monolíticas se acondicionaron con un tiempo de contacto de NaOH mínimo de 120 minutos. Usando el SCD, el NaOH 1.0 M conectado al tubo de limpieza de entrada se reemplazó con NaOH 0.1 M (>4 L/columna). Todas las entradas, salidas y el sistema se enjuagaron con NaOH 0.1 M (en esta etapa las columnas se pueden almacenar conectadas al sistema). Usando el SCD, el NaOH 0.1 M conectado al tubo de limpieza de entrada se reemplazó con WFI (>6.5 L/columna). Todas las entradas, salidas y el sistema se enjuagaron con WFI. Usando el SCD, la solución amortiguadora de equilibrado (>7 L/columna) se conectó a A1, S1 y S2, la solución amortiguadora de elución (>3 L/columna) a A2, y WFI (> 4.5 L/columna) a B2. NaOH 1.0 M se conectó a B1. Utilizando el tubo de limpieza, la solución amortiguadora de equilibrado se conectó a A1, S1 y S2. Todas las entradas, salidas y el sistema se enjuagaron con las soluciones amortiguadoras respectivas. Cuando se completó el enjuague, los tubos de salida se vaciaron abriendo la ventilación adjunta. Usando el SCD, la bolsa de desechos en F1 fue reemplazada por una bolsa de desechos nueva. Usando el SCD, dos bolsas estériles de 20 L se conectaron a F3 para recolectar el flujo para cada columna. La bolsa 2 se cerró con una abrazadera. Usando el SCD, dos bolsas estériles de 5 L se conectaron a F5 para recolectar las fracciones de lavado de cada columna. Usando el SCD, se conectó una bolsa estéril de 1 L a F7 para recolectar la fracción de elución (la elución de la columna 1 y 2 se agrupa en una bolsa).

#### Preparación de muestra

60 El material tratado con benzonasa se conectó a una bolsa/botella estéril de 50 L colocada en un agitador orbital/placa de agitación utilizando el SCD. Se colocó un cabezal de bomba peristáltica entre la suspensión de virus y el recipiente vacío. El volumen sin purificar se bombeó completamente en el recipiente vacío. Usando el SCD, la solución amortiguadora de preparación de la muestra (>10 L) se conectó al recipiente de 20 L. Se colocó un cabezal de bomba peristáltica entre la solución amortiguadora y el recipiente que ya contenía la suspensión de virus de 10 L. Se debe añadir un volumen igual de solución amortiguadora de preparación de la muestra al grupo de virus para llevar la concentración de sulfato de amonio a 1.8 M. El bombeo de la solución amortiguadora y la agitación de la solución deben realizarse de una manera muy suave para que se vea un vórtice, pero no se observe espuma.



Purificación de virus y VLP/RSP

5 La solución de virus diluida se conectó a una de las líneas de derivación de la entrada S1, usando el SCD. La derivación en S1 se usa para eliminar el aire de la línea. Se debe asegurar que no se introduzca aire en la entrada S1 posteriormente. De lo contrario, solo parte del material del virus se procesará en la columna correspondiente. La purificación se realizó tal como se indica en la tabla 18. El pico del virus se recolecta en F7 con monitorización UV (inicio >50 mAU, terminación después de 4 volúmenes de columna). En función de la resolución y los parámetros seleccionados para la purificación de columna y en función del material de columna, se obtendrá un pico de producto que comprenda las partículas de virus quimérico recombinante derivadas de un andamiaje de virus del sarampión que incluya material de ácido nucleico de un virus del Zika empaquetado allí y, opcionalmente, (si están presentes) partículas similares a virus o partículas subvirales recombinantes en un pico. Alternativamente, se pueden obtener dos picos separados, uno que comprende las partículas de virus infeccioso recombinante y el otro que comprende VLP/RSP desprovistas de material de ácido nucleico. En el caso de coelución, como se ejemplifica en este ejemplo, la población mixta que comprende tanto las partículas de virus infeccioso recombinante que comprenden antígenos del virus del Zika como las partículas similares a virus puede purificarse, pulirse o someterse opcionalmente a un intercambio de solución amortiguadora según se detalló anteriormente. Para la coelución, se eligieron los siguientes parámetros: presión máxima de 5.0 bar. Después de finalizar la ejecución, todas las salidas se vaciaron abriendo la ventilación en la salida. Las ventilaciones y bolsas de salida se cerraron con abrazaderas y las bolsas se desconectaron de las salidas con el SCD. La recolección del producto durante la elución se determinó mediante lectura de UV<sub>280</sub> en el detector UV. La recolección del pico principal se inició cuando UV<sub>280</sub> es >50 mAU, y se detuvo cuando un mínimo de 4 volúmenes de columna de la solución amortiguadora de elución habían pasado a través de la columna. Los parámetros de la recolección del pico se tabulan en la tabla 19 a continuación. Al final del ciclo de purificación, se observó el volumen exacto de la fracción del pico principal y el grupo de virus a granel se congeló rápidamente a -80°C ± 10°C de manera directa o alícuota según fuera necesario antes de la congelación. Alternativamente, parte del grupo de virus puede someterse inmediatamente a un análisis adicional, incluyendo análisis de pureza e infectividad y similares. La fracción del pico principal puede someterse adicionalmente a una nueva ronda de purificación, pulido o intercambio de solución amortiguadora para separar partículas de virus infeccioso recombinante que contienen material genético de partículas similares a virus presentes opcionalmente. Usando el SCD, EtOH al 20% se conectó a la entrada de solución amortiguadora B3. El sistema se enjuagó con EtOH al 20%. Usando el SCD, todas las soluciones amortiguadoras de las entradas del sistema Äkta Pilot se desconectaron y desecharon, la pieza en T en la entrada S1 se desconectó y eliminó, y un tubo de limpieza se conectó a las entradas S1, S2, A1, A2, B1, B2 y B3. El tubo de entrada de limpieza se conectó a NaOH 1M. Todas las entradas, salidas y el sistema se limpiaron con NaOH 1 M. El NaOH 1 M conectado al tubo de limpieza se reemplazó con WFI. El sistema se enjuagó con WFI. El WFI conectado al tubo de limpieza se reemplazó con un EtOH al 20%. El sistema Äkta Pilot se almacenó en EtOH al 20%.

**Ejemplo 11: pruebas**

40 Después de la purificación, el material se analizó de acuerdo con la especificación en la tabla 4 a continuación.

Tabla 4 Especificación de las pruebas

Categoría de prueba	Método de prueba	Criterios de aceptación
Potencia	Titulación del virus del sarampión por TCID <sub>50</sub> (infectividad)	≥ 10 <sup>4</sup> TCID <sub>50</sub> /ml
Identidad	Determinación de la identidad de la vacuna de sE o RSP del MV por PCR	Producto de amplificación de 321 pb observado para PCR1
		Producto de amplificación de 621 pb observado para PCR2
Físico-química	Determinación potenciométrica del pH	7.5 ± 0.5
	Contaminación por partículas: partículas visibles	Líquido incoloro, de transparente a opaco (puede haber partículas relacionadas con el producto visibles)
Pureza	Esterilidad	Sin crecimiento
	Inmunoensayo enzimático (EIA) para la detección y cuantificación de benzonasa residual en una muestra de prueba	Por debajo de 100 ng/ml
	Detección y cuantificación de ADN Vero residual en muestras biológicas	Por debajo de 10 ng/dosis
	ELISA de proteína de célula huésped (HCP) Vero	Por debajo de 5 µg/ml
	Detección de albúmina sérica bovina (BSA) por ELISA	Por debajo de 500 ng/ml

Las impurezas relacionadas con el proceso se determinaron utilizando los siguientes kits y ensayos: (i) para la detección y cuantificación del ADN de la célula huésped Vero residual: Kit de ELISA Cygnus; (ii) detección y cuantificación de ADN Vero residual en muestras biológicas: ensayo de qPCR Life Technologies; (iii) para la detección de albúmina sérica bovina: Kit de ELISA Cygnus; y (iv) para la detección de benzonasa residual: Kit de ELISA Merck.

#### Ejemplo 12: caracterización de candidatos de vacunas de MV *in vitro*

Los virus de sE (ver SEC ID N°.: 57) y RSP (ver SEC ID N°.: 58) del MV del Zika se rescataron como se detalló anteriormente y sus propiedades biológicas se determinaron en un cultivo celular. En primer lugar, se analizaron las propiedades de crecimiento de sE y RSP del MV del Zika, y se compararon con el MV Schwarz original. Las secuencias son conformes con SEC ID N°.: 59, y preferentemente conformes con cualquiera de SEC ID N°.: 60 o 192. Los análisis de la curva de crecimiento se realizaron en células Vero 10-87. Para este fin, las células se infectaron con una MOI definida (MOI de 1, 0.1 o 0.01) y se tomaron muestras en diferentes intervalos de tiempo. Ambos virus, sE del MV del Zika y RSP del MV del Zika, exhibieron una cinética de crecimiento similar a la cepa original MV Schwarz según lo determinado por TCID<sub>50</sub> y/o qPCR. Además, la expresión del antígeno de las proteínas sE y E del Zika, respectivamente, se determinó mediante la tinción de inmunofluorescencia indirecta y mediante el análisis de transferencia Western. De este modo, las células Vero 10-87 se infectaron con una MOI definida (1, 0.1 o 0.01). Dependiendo de la MOI utilizada, las células exhibieron una tinción brillante para las proteínas sE y E del Zika, lo que indica que las proteínas sE y/o E del Zika se pueden expresar a partir de la estructura principal del vector del virus del sarampión. Además, las proteínas sE del Zika y/o E del Zika se detectaron en muestras de lisado celular infectadas con sE del MV del Zika y RSP del Zika y en sobrenadantes recolectados de estas células infectadas, respectivamente, mediante el análisis de transferencia Western. Además, las proteínas sE del Zika o E del Zika asimismo se detectaron en sobrenadantes de células infectadas con sE y RSP del MV del Zika mediante el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) usando anticuerpos específicos. Los anticuerpos adecuados, por ejemplo, que se utilizan actualmente con fines de diagnóstico, están disponibles para un experto.

Además, diferentes hibridomas específicos del virus del Zika (por ejemplo, ZIKV-2, ZIKV-13, ZIKV-16 y ZIKV-23) están disponibles, previa solicitud, en la Washington University. La integridad de las inserciones de sE y RSP del virus del Zika presentes en el genoma del virus se confirmó mediante la secuenciación de Sanger bicatenaria. De manera adicional a lo anterior, los virus sE y RSP del MV del Zika se pasaron adicionalmente (hasta el pase 8) para verificar la estabilidad genómica de la inserción del virus del Zika. Tal como se determinó mediante la secuenciación de Sanger, no se encontraron cambios en las secuencias de inserciones del Zika, lo que demuestra la estabilidad de dichas inserciones y, por lo tanto, la idoneidad de las construcciones relevantes.

#### Ejemplo 13: experimentos de inmunización

Con el fin de evaluar la inmunogenicidad del material purificado, es decir, la composición inmunógena que comprende por lo menos un antígeno del virus del Zika tal como se obtiene a partir de SEC ID N°.: 57 y 58 (sE y RSP del MV del Zika, respectivamente) (purificada o no purificada), se analizó adicionalmente mediante los siguientes estudios en animales:

Para evaluar la inmunogenicidad de los candidatos de vacuna de MV del Zika en un modelo animal, se vacunaron grupos de ratas algodóneras por vía intramuscular con diversas dosis de sE del MV del Zika (según comprende SEC ID N°.: 57) y RSP del MV del Zika (según comprende SEC ID N°.: 58), respectivamente. En todos los casos, una sola inmunización fue suficiente para inducir anticuerpos específicos de sE del Zika o E del Zika en el suero cuando se midió cuatro semanas después de la primera vacunación con respecto al material de virus tanto purificado como no purificado. A todas las ratas algodóneras se les administró una inmunización de refuerzo homóloga cuatro semanas después de la primera, y esto dio como resultado un aumento en los anticuerpos específicos de sE del Zika o E del Zika cuando se midieron tres semanas después. Para analizar los anticuerpos, se pueden llevar a cabo ensayos ELISA, pruebas de neutralización de reducción de placa (PRNT) o métodos comparables para medir los anticuerpos neutralizantes específicos de virus. Los anticuerpos específicos del Zika y de reacción cruzada están disponibles actualmente. Los anticuerpos adecuados, por ejemplo, que se utilizan actualmente con fines de diagnóstico, están disponibles para un experto. Además, diferentes hibridomas específicos del virus del Zika (por ejemplo, ZIKV-2, ZIKV-13, ZIKV-16 y ZIKV-23) están disponibles, previa solicitud, en la Washington University.

Para evaluar la respuesta de células T provocada por los candidatos de vacuna del MV-ZIKA, se inmunizaron ratas algodóneras hembra, de 6-8 semanas de edad, dos veces con  $1 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub> de sE y RSP del MV del Zika, respectivamente. Se utilizó MV-Schwarz sin ATU (SEC ID N°.: 59) o con ATU (ver, por ejemplo, SEC ID N°.: 60 o 192) como control negativo. Una semana después de la segunda inmunización, se sacrificaron las ratas algodóneras y se recolectaron los esplenocitos. Las células se estimularon *in vitro* con péptidos específicos de patógenos, y el número de células T productoras de interferón gamma (IFN $\gamma$ ) se determinó mediante ELISPOT. En comparación con el control MV-Schwarz (aquí SEC ID N°.: 60 o 192), los candidatos de vacuna de MV del Zika indujeron la producción de células T específicas de ZIKV, lo que indica que los antígenos de Zika pueden inducir

una respuesta inmunitaria celular dirigida contra la indicación objetivo y, por lo tanto, representan candidatos de vacunas adecuados que muestran un efecto humoral protector, así como una respuesta inmunitaria celular protectora en un modelo animal.

#### 5 **Ejemplo 14: estudios de seguridad y toxicidad**

Para evaluar la seguridad y toxicidad potencial de la vacuna del MV del Zika inmunógena (para sE del MV del Zika, ver SEC ID N°.: 57, o para RSP del MV del Zika, ver SEC ID N°.: 58), un estudio de toxicidad de dosis única, así como de dosis repetidas, se realizó en macacos cynomolgus en condiciones de buenas prácticas de laboratorio (BPL). El grupo 2, compuesto por tres macacos cynomolgus criados a propósito con tres machos y tres hembras fue tratado el día 1, y el grupo 3, asimismo compuesto por tres machos y tres hembras, los días 1, 22 y 36 por vía intramuscular de la composición de vacuna inmunógena contra el Zika. Los animales fueron seronegativos al virus del sarampión y del Zika. Otro grupo de control, el Grupo 1, que comprendía tres machos y tres hembras, recibió solamente el vehículo (solución salina estéril) los días 1, 22 y 36. El tratamiento se llevó a cabo a una dosis en el intervalo de  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>/día de inyección. Una dosis, por ejemplo, podría ser de aproximadamente  $5 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/día. Esta dosis puede variar de forma natural según el lote específico analizado y según el material disponible, y puede ser aún menor (por lo menos un logaritmo) o mayor, según lo evaluado a partir de la prueba previa.

Después de la experimentación previa, la dosis de  $9.45 \times 10^6$  de sE del MV del Zika se usó para experimentos adicionales. Esta dosis representa la dosis humana máxima prevista para uso en pruebas clínicas. Se tomaron muestras de sangre para la determinación de los niveles séricos de anticuerpos contra el antígeno de la vacuna, para la serología del sarampión y para hematología y bioquímica en diversos intervalos de tiempo. Con el fin de determinar la inmunogenicidad, se tomaron muestras de sangre en la prueba previa y en el día 11 después de la vacunación del Grupo 2 que recibió únicamente una inmunización, y en la prueba previa, el día 11, 22, 36, 50 y 64 del Grupo 3 que recibió tres vacunaciones. Se tomaron muestras de sangre para la serología del sarampión una vez en la prueba previa, el día 11 del Grupo 2 y el día 22 de los otros grupos. Se tomaron muestras de sangre para determinar la hematología y bioquímica sanguínea para todos los animales en la prueba previa y el día de la autopsia. No se produjeron muertes no programadas durante el estudio. No hubo signos clínicos relacionados con los elementos de la prueba durante los períodos de tratamiento y sin tratamiento. El MV-ZIKA fue bien tolerado localmente y no se observaron signos de toxicidad sistémica a lo largo del estudio. La seroconversión al virus del sarampión se observó en todos los animales que recibieron el material de prueba de MV-Zika que comprendía el material de acuerdo con SEC ID N°.: 57 (D11 Grupo 2 y D22 Grupo 3). La seroconversión a Zika se observó en 5/6 animales del Grupo 3, tal como se determinó en D22 después de la primera inmunización. Además, se encontraron anticuerpos neutralizantes en 4/6 animales de este grupo después de la segunda vacunación, tal como se determinó mediante la prueba de microneutralización.

Dichos datos demuestran que las composiciones inmunógenas en efecto proporcionan una respuesta inmunitaria protectora en un mamífero *in vivo* y, por lo tanto, representan candidatos de vacuna prometedores para la inmunización para lograr una protección amplia contra el virus del Zika sobre la base de una respuesta inmunitaria protectora humoral y adicionalmente una respuesta inmunitaria celular protectora inducida por los anteriores candidatos de vacuna en un modelo animal de macaco. Además, se pueden obtener anticuerpos adecuados cuando se usan las moléculas de ácido nucleico y las composiciones inmunógenas del Zika, que a su vez se pueden usar para proporcionar anticuerpos terapéuticos, que pueden usarse para tratar una infección por el virus del Zika.

#### 45 **Ejemplo 15: otros experimentos de inmunización**

Con el fin de evaluar la inmunogenicidad del material purificado, es decir, las composiciones inmunógenas y las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención si se clona en un andamiaje del virus del sarampión (MV-Zika p), en comparación con el material crudo sin purificar (MV-Zika np), se pueden realizar los siguientes estudios en animales adicionales:

1. Respuesta humoral después de dos inmunizaciones
2. Respuesta de células T después de dos inmunizaciones

El modelo animal de elección para esta configuración sería un ratón transgénico que porta el receptor de entrada de MV humano CD46 (ver anteriormente). Además, estos ratones son deficientes en el receptor de interferón tipo 1 (CD46<sup>tg</sup>/IFNAR<sup>-/-</sup>). En estudios previos, se demostró la inmunogenicidad de diversas construcciones basadas en MV/Schwarz (MV-CHIK, MV-DENV, etc.). Las ratas aldoneras hembra asimismo podrían usarse para este fin, tal como se detalló anteriormente. Un resultado de este tipo de estudio sería:

La formulación A (purificada, MV-Zika p, por ejemplo, sobre la base de SEC ID N°.: 57 (sE) o 58 (RSP)) induce estas respuestas humorales y celulares en 6 ratones o ratas aldoneras; la formulación B (sin purificar, MV-Zika) induce esta respuesta inmunitaria. Para el estudio de la respuesta inmunitaria humoral se propone la siguiente configuración de estudio:

65 ratones CD46<sup>tg</sup>/IFNAR<sup>-/-</sup> de 5-6 semanas de edad o ratas aldoneras de 6-8 semanas de edad que recibirán dos

inmunizaciones. Es posible cuantificar y comparar los niveles de anticuerpos después de la primera inmunización y la inmunización de refuerzo según lo determinado por ELISA y/o NT.

Tabla 5

Grupo	No. de ratones / ratas algotoneras	Tratamiento	Dosis (MV-X)	Esquema de vacunación
1	6	MV-Zika p Formulación A	1x10 <sup>3</sup> o más	Día 0, 28
2	6	MV-Zika np Formulación B	1x10 <sup>3</sup> o más	Día 0, 28
4	6	MV-Schw (por ejemplo, sobre la base de SEC ID N°.: 59, 60 o 192)	-	Día 0, 28

Las dosis preferibles podrían ser: 1x10<sup>3</sup> a 1x10<sup>6</sup>.

Estudio de células T - células que producen IFN $\gamma$  después de dos inmunizaciones

Los ratones se inmunizarán con una dosis baja de MV-Zika (Formulación A (purificada) o B (no purificada)) o un control MV/Schwarz. Una semana después de la segunda inmunización, los ratones serán sacrificados y se recolectarán los esplenocitos. Las células se estimularán *in vitro* con péptidos específicos de patógenos, y el número de células T productoras de interferón gamma (IFN $\gamma$ ) se determinarán mediante ELISPOT. De este modo, la inmunogenicidad, la seguridad y las ventajas de los esquemas de purificación que se divulgan en la presente memoria se pueden probar simultáneamente en este modelo de ratón.

Los ratones se inmunizarán con una dosis baja de sE o RSP del MV-Zika (Formulación A (purificada) o B (no purificada)), tal como se detalló anteriormente, o con un control MV/Schwarz. Los ratones CD46<sup>tg</sup>/IFNAR<sup>-/-</sup> hembra de 5-6 semanas de edad recibirán dos inmunizaciones, tal como se detalló anteriormente (dosis preferidas: 1x10<sup>3</sup> a 1x10<sup>6</sup>). Durante la inmunización o de manera posterior a la misma, los ratones hembra se aparearán. Los ratones hembra preñados se expondrán al virus del Zika. Se evaluará si la protección de los ratones hembra tratados previamente con los candidatos de vacuna contra el Zika asimismo protegerá a los fetos de dichos ratones de la infección por el virus del Zika.

#### Ejemplo 16: expresión de antígenos sE y RSP del Zika mediante el uso de vectores lentivirales

Para la construcción de vectores de transferencia lentivirales que codifican los antígenos sE y RSP del Zika, las secuencias de sE del Zika y RSP del Zika de acuerdo con SEC ID N°.: 55 y 56 se amplificaron mediante PCR con cebadores que incluían sitios de restricción NheI/NotI y pCDNA3.1-sE y pCDNA3.1-RSP como molde, respectivamente. Las reacciones de PCR que produjeron una banda distinta con el tamaño correspondiente según se visualizó mediante electroforesis en gel se purificaron adicionalmente y se insertaron en pCR2.1-TOPO (Invitrogen Life Technologies) utilizando el kit TOPO® TA Cloning®. Para la transformación y amplificación, se usaron células DH5 $\alpha$  de *E. coli* competentes. Los plásmidos que contenían los antígenos sE y RSP del Zika intactos se determinaron por secuenciación de Sanger, y la secuencia del antígeno del Zika deseada se clonó adicionalmente en el lentivector pCDH-CMV-MSC (SBI) mediante NheI/NotI usando sitios de restricción NheI/NotI para generar los plásmidos pCDH-CMV-sE y pCDH-CMV-RSP, respectivamente.

Los vectores lentivirales se produjeron utilizando células 293T y el reactivo de transfección PureFectin (SBI). Las células 293T se sembraron en matraces de cultivo celular de 175cm<sup>2</sup>. Después de una incubación durante la noche, estas células se transfectaron usando un sistema de vector de lentivirus de tres plásmidos estándar para producir vectores de lentivirus pseudotipados con la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G). Las construcciones del lentivector pCDH-CMV-sE y pCDH-CMV-RSP, respectivamente, se transfectaron en estas células 293T junto con plásmidos de empaquetamiento que expresan las proteínas de HIV requeridas para el empaquetamiento y la formación de partículas y un plásmido que expresa VSV-G. El medio se intercambié 1 día después de la transfección y las partículas de pseudovirus HIV-pCDH-CMV-sE y HIV-pCDH-CMV-RSP (VSV-G) se recolectaron 2-3 días después de la transfección, respectivamente. Para la recolección de partículas, los sobrenadantes se eliminaron de los restos celulares mediante centrifugación a 3,000 x g durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las partículas pseudovirales se concentraron adicionalmente mediante centrifugación a 100,000 x g durante 3 horas a 4°C. Los sedimentos se resuspendieron en DMEM que contenía solución amortiguadora HEPES 25 mM y se almacenaron por debajo de -65°C. Posteriormente, las células objetivo (es decir, células Vero 10-87) se transdujeron con una MOI definida de partículas de HIV-pCDH-CMV-sE y HIV-pCDH-CMV-RSP (VSV-G) y la expresión de los antígenos sE y RSP del Zika se determinó mediante tinción de inmunofluorescencia indirecta y análisis de transferencia Western usando anticuerpos específicos de ZIKV. Por lo tanto, las composiciones inmunógenas derivadas de sE y RSP del Zika asimismo pueden obtenerse independientemente de la estructura principal del vector seleccionada para producir composiciones inmunógenas adecuadas para fines de vacunación.

## REIVINDICACIONES

1. Composición inmunógena que comprende por lo menos una partícula de virus de sarampión infecciosa, en la que la partícula de virus infecciosa comprende una estructura principal de vector de virus de sarampión y una proteína E de virus del Zika o un fragmento funcional de una proteína E de un virus del Zika, en la que la partícula de virus de sarampión infecciosa comprende como su genoma dos secuencias de ácido nucleico, en la que la primera secuencia de ácido nucleico es una secuencia que codifica una proteína E de un virus de Zika o un fragmento funcional de una proteína E de un virus del Zika, y en la que la primera secuencia de ácido nucleico está operativamente ligada a una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende la estructura principal de vector de virus del sarampión, en la que la composición inmunógena comprende opcionalmente por lo menos un vehículo y/o excipiente aceptable farmacéutica y/o veterinariamente, en la que la composición inmunógena no comprende una secuencia de ácido nucleico adicional que codifica una proteína no estructural de un flavivirus; y
- (a) en la que la una primera secuencia de ácido nucleico comprende, en orden secuencial,
- (i) una secuencia de ácido nucleico que codifica dos residuos de aminoácidos básicos, en la que los dos residuos de aminoácidos básicos presentan la secuencia arginina-arginina,
- (ii) una secuencia que codifica una secuencia de señal para una proteína premembrana de un virus del Zika o para un fragmento funcional de una proteína premembrana de un virus del Zika,
- (iii) una secuencia que codifica una proteína premembrana de un virus del Zika o un fragmento funcional de la misma,
- (iv) una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de señal para una proteína E de una proteína E de virus del Zika o para un fragmento funcional de una proteína E de un virus del Zika, y
- (v) una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína E de virus del Zika o un fragmento funcional de una proteína E de un virus del Zika, y
- (vi) en la que la primera secuencia de ácido nucleico no comprende una secuencia que codifica una región de tallo-anclaje de una proteína E de un virus del Zika, o una región de tallo-anclaje heteróloga para una proteína E de un virus del Zika; o
- (b1) en la que la primera secuencia de ácido nucleico comprende, en orden secuencial,
- (i) una secuencia de ácido nucleico que codifica dos residuos de aminoácidos básicos, en la que los dos residuos de aminoácidos básicos presentan la secuencia arginina-arginina,
- (ii) una secuencia que codifica una secuencia de señal para una proteína premembrana de un virus del Zika o para un fragmento funcional de una proteína premembrana de un virus del Zika,
- (iii) una secuencia que codifica una proteína premembrana de un virus del Zika o un fragmento funcional de la misma,
- (iv) una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de señal para una proteína E de una proteína E de virus del Zika o para un fragmento funcional de una proteína E de un virus del Zika, y
- (v) una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína E de un virus del Zika o un fragmento funcional de la misma que presenta una mutación en la posición de aminoácido 107 en comparación con la secuencia de SEC ID N°: 40 a 52 o 130 a 150 que representan las proteínas E de tipo silvestre de un virus del Zika, y
- (vi) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una región de tallo anclaje de una proteína E de un virus del Zika, o una región de tallo-anclaje heteróloga para una proteína E de un virus del Zika; o
- (b2) en la que la primera secuencia de ácido nucleico es como se define en (b1) y comprende una mutación L107D en comparación con la secuencia de SEC ID N°: 40 a 52 o 130 a 150 en la proteína E de un virus del Zika o el fragmento funcional de la misma codificada por la primera secuencia de ácido nucleico; o
- (c) en la que la primera secuencia de ácido nucleico comprende, en orden secuencial,
- (i) una secuencia de ácido nucleico que codifica dos residuos de aminoácidos básicos, en la que los dos residuos de aminoácidos básicos presentan la secuencia arginina-arginina,

- (ii) una secuencia que codifica una secuencia de señal para una proteína premembrana de un virus del Zika o para un fragmento funcional de una proteína premembrana de un virus del Zika,
- 5 (iii) una secuencia que codifica una proteína premembrana de un virus del Zika o un fragmento funcional de la misma,
- (iv) una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de señal para una proteína E de una proteína E de virus del Zika o para un fragmento funcional de una proteína E de un virus del Zika, y
- 10 (v) una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína E de virus del Zika o un fragmento funcional de una proteína E de un virus del Zika, y
- 15 (vi) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una región de tallo anclaje de una proteína E de un virus del Zika, o una región de tallo-anclaje heteróloga para una proteína E de un virus del Zika;

en la que la primera secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en SEC ID N°: 53 a 56, o una secuencia que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 20 96%, 97%, 98% o 99% con éstas siempre que la secuencia homóloga aún codifique por lo menos un antígeno funcional de virus del Zika.

2. Composición inmunógena según la reivindicación 1, en la que la estructura principal de vector es de una cepa de virus del sarampión de virus atenuado, siendo la cepa de virus del sarampión seleccionada de entre el grupo 25 que consiste en la cepa Schwarz, la cepa Zagreb, la cepa AIK-C y la cepa Moraten, preferentemente en la que la estructura principal de vector comprende una secuencia según cualquiera de SEC ID N°: 59, 60 o 192.

3. Composición inmunógena según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en la que la composición inmunógena comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en SEC ID N°: 53 a 58 o una secuencia de 30 ácido nucleico que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con éstas siempre que la secuencia homóloga, opcionalmente después de la expresión, aún codifique por lo menos un antígeno funcional de virus del Zika.

4. Molécula de ácido nucleico que comprende una primera secuencia de ácido nucleico como se define en la 35 reivindicación 1 parte (a), (b1), (b2), o (c).

5. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 4, en la que la primera secuencia de ácido nucleico se 40 selecciona de entre el grupo que consiste en SEC ID N°: 53 a 56 o una secuencia que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con éstas siempre que la secuencia después de la expresión aún codifique un antígeno funcional del virus del Zika.

6. Partícula de virus de sarampión infecciosa como se define en la reivindicación 1.

7. Célula huésped que comprende una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 4 o 5, o que comprende 45 una partícula de virus de sarampión infecciosa según la reivindicación 6.

8. Método para producir una partícula de virus de sarampión infecciosa según la reivindicación 6, o para producir 50 una composición inmunógena según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, comprendiendo el método las etapas siguientes:

- (i) insertar una primera secuencia de ácido nucleico como se define en la reivindicación 1 parte (a), (b1), (b2), 55 o (c) en una estructura principal de vector de sarampión como se define en las reivindicaciones 1 y 2 para ligar operativamente la secuencia de ácido nucleico y la estructura principal de vector para obtener una secuencia de virus quimérico recombinante;
- (ii) infectar por lo menos una célula huésped con por lo menos una secuencia de virus quimérico recombinante obtenida en la etapa (i) para obtener una muestra de virus;
- (iii) clarificar la muestra de virus de la etapa (ii);
- 60 (iv) purificar la muestra de virus clarificado de la etapa (iii);
- (v) opcionalmente: formular el por lo menos un virus quimérico recombinante con por lo menos un vehículo y/o excipiente aceptable farmacéutica y/o veterinariamente;
- 65 (vi) obtener la partícula de virus de sarampión infecciosa, o la composición inmunógena.

9. Método según la reivindicación 8, que comprende una etapa de purificación (iv), en el que la etapa de purificación comprende la purificación por medio de cromatografía, opcionalmente, en el que la purificación es seguida por una etapa de pulido adicional.
- 5
10. Método según la reivindicación 8 o 9, en el que la célula huésped se selecciona de entre el grupo que consiste en células Vero, células de fibroblasto de embrión de pollo, células HEK293, células HeLa, células pulmonares de rhesus fetal o células MRC5.
- 10
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que el método comprende una etapa adicional, que comprende:
- (vii) separar las partículas subvirales recombinantes de las partículas infecciosas.

**Figura 1**

