



Salud Uninorte

ISSN: 0120-5552

saluduninorte@uninorte.edu.co

Universidad del Norte

Colombia

Moneriz Pretell, Carlos; Rojas Serrano, Luz Nery; Castro Salgado, Cristian  
Nuevos enfoques prometedores en el tratamiento frente al virus chikungunya

Salud Uninorte, vol. 32, núm. 2, mayo-agosto, 2016, pp. 276-291

Universidad del Norte

Barranquilla, Colombia

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81748361010>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

## Nuevos enfoques prometedores en el tratamiento frente al virus chikungunya

### Promising new approaches in the treatment against the chikungunya virus

Carlos Moneriz Pretell<sup>1</sup>, Luz Nery Rojas Serrano<sup>2</sup>, Cristian Castro Salgado<sup>3</sup>

#### Resumen

*El virus chikungunya es un patógeno transmitido por mosquitos que tiene un impacto importante en la salud de los seres humanos, causa enfermedad febril aguda, dolores en las articulaciones y en muchos casos artralgia persistente que dura semanas o años. El resurgimiento de este virus ha dado lugar a numerosos brotes en varios países del mundo, con amenaza de propagarse aún más en un futuro próximo. Actualmente no hay fármacos antivirales o vacunas registradas para la prevención y tratamiento de la infección por chikungunya. En esta revisión se presentan las diferentes perspectivas del estado actual de la investigación sobre fármacos antivirales y vacunas en fases de desarrollo para la infección del virus chikungunya.*

**Palabras clave:** chikungunya, VCHIK, fiebre, antivirales, vacunas.

#### Abstract

*Chikungunya virus is a mosquito-borne pathogen that has a major impact on the health of humans, causing acute febrile illness, pain in joints and in many cases persistent joint pain that lasts for weeks or years. The resurgence of this virus has led to numerous outbreaks in several countries, threatening to spread further in the near future. There are currently no vaccines or drugs for prevention and treatment of infection by chikungunya. In this review, presents the different perspectives of the current state of research on antiviral drugs and vaccines in development stages for chikungunya virus infection.*

**Keywords:** chikungunya, VCHIK, fever, antivirals, vaccines.

Fecha de recepción: 26 de octubre de 2015  
Fecha de aceptación: 3 de febrero de 2016

<sup>1</sup> Director Grupo Bioquímica y Enfermedad. Ph.D. Docente de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Cartagena (Colombia). cmonerizp@unicartagena.edu.co

<sup>2</sup> Coinvestigadora Grupo Bioquímica y Enfermedad. Joven investigador de Colciencias. Facultad de Medicina, Universidad de Cartagena (Colombia). luznery7@hotmail.com

<sup>3</sup> Coinvestigador Grupo Bioquímica y Enfermedad. Joven investigador de Colciencias Facultad de Medicina. Universidad de Cartagena. castrosalguedo@hotmail.com

**Correspondencia:** Carlos Moneriz Pretell. Campus de Zaragocilla, Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Cartagena (Colombia). Teléfono: (055) 6698176, ext. 130; fax: (055) 6698177. cmonerizp@unicartagena.edu.co

## INTRODUCCIÓN

El virus chikungunya (VCHIK) es un alfavirus, perteneciente a la familia *Togaviridae* (1). Es transmitido por picaduras de mosquitos del género *Aedes* (*A. aegypti* y *A. albopictus* principalmente) (2). El VCHIK es el agente etiológico de la fiebre chikungunya, enfermedad caracterizada por altas temperaturas repentinas, mialgia, náuseas, fatiga, dolores de cabeza, erupción cutánea y dolores severos en las articulaciones. Este último síntoma es el más representativo y puede perdurar por semanas, meses o incluso años (3), con posibilidades de ocasionar artritis reumatoide en algunos casos (4, 5). Normalmente la enfermedad es autolimitada, no fatal y de pronta resolución, aunque con el aumento del número de casos se han observado formas graves que anteriormente no habían sido reportadas, en las que puede existir compromiso del sistema nervioso (6,7).

La fiebre de chikungunya es considerada una enfermedad emergente, conocida por producir algunas epidemias esporádicas en África y Asia (8). Sin embargo, desde 2004 se ha ampliado su área de distribución geográfica en el resto del planeta (8). Hoy en día se reportan periódicamente un alto número de casos a nivel mundial y se ha convertido en un problema de salud pública en los países en los que el virus está presente (9).

La enfermedad producida por VCHIK es tratada sintomáticamente y las medidas utilizadas están encaminadas a aliviar sus manifestaciones clínicas mediante el uso de antipiréticos, analgésicos, antiinflamatorios y líquidos, los cuales en algunos casos no son suficientes (10).

En la actualidad no existe una vacuna o moléculas antivirales aprobadas para la infección del VCHIK. El amplio comportamiento epidemiológico del virus y su morbilidad grave

asociada con la enfermedad clínica justifica con urgencia el descubrimiento de nuevas moléculas y vacunas (10, 11).

Si bien existen muchos candidatos a vacunas promisorios, solo algunos pocos se encuentran en estudios de fase clínica en humanos. Sin embargo, sus resultados son prometedores e impulsan la idea de una obtención muy pronta de esta medida de prevención inmunológica.

En este trabajo se presenta una revisión actual de los diferentes enfoques de antivirales y vacunas en fase de desarrollo utilizados para prevenir y tratar la infección por VCHIK, enfermedad que ha recobrado interés en los últimos años y que representa una amenaza para la calidad de vida de las personas que la padecen.

## METODOLOGÍA

Se realizó una revisión bibliográfica narrativa a partir de la búsqueda en las bases de datos PubMed y Science Direct. Se incluyeron diferentes tipos de publicaciones, tales como artículos originales y de revisión sobre los nuevos enfoques prometedores de tratamientos con relación a vacunas y moléculas antivirales frente a VCHIK. Se evaluaron los títulos de los artículos encontrados. En caso de relacionarse con el objetivo de la revisión, fueron analizados todos los resúmenes de los artículos identificados con la finalidad de realizar una nueva selección. Se seleccionaron 63 artículos, los cuales fueron considerados por su pertinencia a la revisión temática y revisados en texto completo. Los artículos se citaron a lo largo de esta revisión.

### Ciclo viral

El ciclo de replicación del VCHIK (figura 1) ha ofrecido un buen punto de partida para la

identificación de posibles blancos terapéuticos en el desarrollo de compuestos antivirales.

El virus VCHIK se compone de una cadena sencilla de ARN con polaridad positiva y envuelto en una cápside icosaédrica (10, 12). El genoma del VCHIK es de aproximadamente 11 kb de longitud y se compone de dos marcos de lectura abiertos: un marco de 7 kb, que codifica las proteínas no estructurales virales (nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4), implicadas en la replicación del ARN, y un marco de 4 kb, que codifica las proteínas estructurales virales, incluyendo las proteínas de la cápside (C) y las proteínas de la envoltura (E1, E2, E3 y 6k), las cuales participan en la encapsulación y la liberación del virus de su célula huésped (10, 12). El virus entra en la célula huésped por endocitosis mediada por receptores; durante la fase temprana de la infección, las células más susceptibles de invasión son los monocitos, aunque su reproducción también es llevada a cabo en macrófagos, fibroblastos y células endoteliales, donde al ingresar el virus fusiona su envoltura con la membrana endosomal. Seguidamente, se libera la nucleocápside en el citoplasma, la cual desprende el genoma viral (ARN 49S). Una vez que el genoma está en el citoplasma, se origina la traducción del ARN viral por la maquinaria de traducción de la célula huésped, produciendo replicasa viral y proteínas no estructurales virales (nsPs). La replicasa del virus genera más copias del genoma viral, así como la de un ARN subgenómico (26S), el cual codifica las proteínas estructurales. Finalmente, los componentes virales se ensamblan nuevamente en una nucleocápside que se libera fuera de las células infectadas (10, 12).

### Inhibidores de la entrada viral

La inhibición de la entrada del VCHIK presenta una estrategia terapéutica atractiva, debido a que puede ser minimizado el daño causado

por factores de virulencia durante la replicación viral intracelular. Además, estos inhibidores podrían dirigirse a componentes extracelulares y receptores de la célula huésped, los cuales son más accesibles y reducen la dosis requerida y los límites de citotoxicidad (12). La cloroquina, arbidol y derivados 10H-fenotiazinas han mostrado actividad importante frente a este mecanismo de acción (tabla 1).

En el caso de la cloroquina, se ha sugerido que altera el proceso de endocitosis del virus, posiblemente a través de la prevención de la acidificación endosomal (12, 13). Sin embargo, la efectividad de este fármaco antimalárico en estudios clínicos frente al VCHIK es controversial y aún no es suficientemente clara (12, 14, 15).

El arbidol es un antiviral de amplio espectro utilizado en el tratamiento y profilaxis de la gripe y otras infecciones respiratorias (16). Este fármaco ha mostrado tener potentes efectos inhibidores frente a la infección de VCHIK en modelos *in vitro* (17). Los estudios realizados hasta la fecha sugieren que el arbidol inhibe la entrada del VCHIK al prevenir su fusión a las células diana, igual como lo hace frente a los virus del tipo influenza (12, 16, 17). Su uso clínico durante más de 15 años en Rusia ha demostrado una óptima tolerancia con mínimos efectos secundarios. Además, no han sido reportadas hasta la fecha cepas del virus resistente a arbidol, lo cual lo convierte en una opción atractiva como fármaco antiviral (18).

Los derivados 10H-fenotiazinas (clorpromazina, perfenazina, etopropazina, tietilperazina, tioridazina y metdilazina) también han mostrado capacidad para inhibir la entrada del VCHIK a su célula huésped (19).

Las fenotiazinas son fármacos antipsicóticos clínicamente aprobados, y su capacidad para atravesar la barrera hemato-encefálica podría ser útil en casos de infección con VCHIK que cursan con complicaciones neurológicas (12, 19).

### **Inhibidores de la replicasa viral**

Aunque las etapas iniciales de la replicación del VCHIK utilizan factores del huésped, la replicación del genoma viral representa un paso que se debe principalmente a factores virales (12). Los esfuerzos para identificar nuevos antivirales también han sido impulsados por el aislamiento de nuevos compuestos procedentes de fuentes naturales.

Pohjala y col. (19) encontraron que cuatro compuestos de origen natural (apigenina, crisina, naringenina y silibina), los cuales contienen en su estructura un anillo de 5,7 dihidroxi-flavonas, mostraban actividad inhibidora de la replicasa viral. Estos compuestos también han mostrado tener propiedades contra el cáncer (20).

Allard y col. (21) realizaron bioensayos a partir de extractos de la corteza de *Trigonostemon cherrieri* y aislaron una nueva serie de diterpenoides ortoésteres llamados trigocherrinas y trigocherriolidos con actividad inhibidora de la replicación del VCHIK.

Otras moléculas como el ID1452-2 y el compuesto 1 son capaces de inhibir la proteína nsP2, afectando con ello la replicación del ARN del virus (22, 23).

### **Inhibidores de la replicación del genoma viral**

Aunque la replicasa viral es fundamental para la generación de nuevas copias del genoma del VCHIK, existen más componentes

moleculares implicados en este proceso de multiplicación. Los siguientes compuestos han sido estudiados debido a su demostrada eficacia para bloquear la capacidad del virus de producir nuevo material genético sin necesidad de atacar la replicasa viral.

### **Ribavirina**

También conocida como virazole, la ribavirina es un nucleósido sintético con un amplio espectro de actividad antiviral (24). Se ha observado *in vitro* una actividad antiviral directa frente al VCHIK con un efecto dosis dependiente, y la combinación de interferón- $\alpha$  y ribavirina ejercen un efecto antiviral sinérgico frente a dos alfavirus (VCHIK y SFV) (25).

Este fármaco ha sido administrado en personas que presentan dolores en las articulaciones por lo menos dos semanas después de un episodio de fiebre (26). Sin embargo, aún se requieren más estudios para confirmar y aclarar el mecanismo de acción de la ribavirina contra el VCHIK.

### **6-azauridina**

Es un análogo de nucleósido que ha demostrado un amplio espectro de actividad antiviral (27). Sin embargo, su actividad antiviral ha sido difícil de replicar en modelos *in vivo* (28). Este fármaco es un inhibidor de la descarboxilasa de monofosfato de orotidina, la cual está implicada en la síntesis de novo de pirimidinas. La eficacia de 6-azauridina requiere una cuidadosa evaluación adecuada en modelos *in vivo* para evaluar la infección por VCHIK.

### **Ácido micofenólico**

Es un inhibidor no competitivo de la IMP deshidrogenasa, y se ha utilizado clínicamente como un inmunosupresor para prevenir el

rechazo de órganos trasplantados (29). Este ácido parece inhibir la replicación del VCHIK por un mecanismo similar a la de ribavirina con una reducción dosis dependiente del número de copias del genoma del virus (30).

### **Inhibidores de la traducción de proteínas virales**

Como en la mayoría de los virus de ARN, la traducción del genoma del VCHIK se lleva a cabo por la maquinaria de traducción de la célula huésped. El ARN de interferencia (ARNi) ofrece un enfoque prometedor para la inhibición de la expresión de proteínas virales atacando selectivamente la plantilla del genoma viral. Se ha reportado que secuencias de ARN de interferencia pequeños (ARNsi) dirigidas frente a genes NSP3 y E1 reducen significativamente ( $P < 0.05$ ) el número de copias del genoma de VCHIK (31). Recientemente un plásmido basado en un ARN de horquilla pequeña (ARNhs) se evaluó como un potencial antiviral frente al VCHIK. Clones celulares estables que expresan ARNhs contra E1 y nsP1 del VCHIK muestran una inhibición significativa ( $P < 0,05$ ) y de la infección por VCHIK (32).

La aprobación de Vitravene1 (Fomivirsen) por la FDA en 1998 para el tratamiento de la retinitis por citomegalovirus después de la infección sugiere que la tecnología ARNi tiene el potencial de ser desarrollada en aplicaciones terapéuticas (33). La eficacia de ARNsi *in vitro* y ARNsh *in vivo* sugiere que ARNi podría ser útil en la lucha contra la infección frente al VCHIK (31).

### **Harringtonina**

La harringtonina es un éster de cefalotaxine, aislado del árbol japonés *Cephalotaxus harringtonia*. En trabajos recientes este compuesto

mostró una importante inhibición del VCHIK, actuando como antagonista de su traducción genómica, impidiendo así el ciclo de replicación viral, deteniendo la producción de ARN viral y la expresión de importantes proteínas (principalmente nsP3 y E2) (34). Estos resultados, sumados a la baja citotoxicidad de este compuesto, lo convierten en un fármaco promisorio e interesante para el futuro tratamiento frente a esta infección.

### **Inhibidores de la maduración de las glicoproteínas virales**

La infección por alfa virus puede ser inhibida *in vitro* mediante el bloqueo de la escisión intracelular de las glicoproteínas de la envoltura viral E2 y E3. En el VCHIK, las glicoproteínas de la envoltura se producen inicialmente como un precursor (E3E2 o p62) y durante la maduración del virión estas proteínas se escinden cerca de su extremo N para formar péptidos E2 y E3 residuales. Este proceso de escisión es fundamental para lograr la maduración del virus y es llevado a cabo por proteínas convertasas (PCs), principalmente las furinas (35).

Trabajos realizados por Ozdeny col. (36) demostraron que en cultivos de células musculares humanas infectadas con VCHIK, y que fueron tratadas con decanoil-RVKR-clorometil cetona (D-RVKR-CMC), se reducía el nivel de infección al restringir significativamente el procesamiento de glicoproteínas E3E2.

El D-RVKR-CMC es un inhibidor de convertasa, el cual limita de manera directa la acción de las furinas y conduce a la formación de partículas virales inmaduras con incapacidad viral de propagación (36).

## Moduladores de la respuesta inmune del huésped

En la infección por VCHIK, la respuesta inmune innata juega un papel principal en búsqueda del esclarecimiento de la enfermedad, sobre todo la activación del interferón de tipo I (IFN), por parte de los Toll-like receptor (TLR 3, 7, y 8) (37).

Esto se fundamenta en la estimulación por parte del IFN de la transcripción de genes que codifican proteínas específicas con actividad antiviral (38). Se ha demostrado que la deficiente funcionalidad en la señalización del IFN tipo I se asocia con las manifestaciones graves que se pueden presentar durante la infección por este virus (39). Varios estudios *in vitro* han reportado inhibición de VCHIK cuando se utiliza IFN- $\alpha$  (25, 40). Por otra parte, el ácido poliinosínico: ácido policitidílico (Poli: I-C), molécula que interactúa con receptores de la respuesta innata (TLR3), ha mostrado capacidad para inhibir *in vitro* la replicación de VCHIK (41), al inducir la producción de elementos con actividad inmune, principalmente el INF  $\alpha$  y  $\beta$  (42, 43).

Todas estas evidencias de los efectos antivirales *in vitro* de IFN, así como los efectos sinérgicos del mismo con otros fármacos, justificaría aun más la exploración de este mecanismo en modelos *in vivo* (12).

## Vacunas

A través de los años, el método más efectivo para el control de las enfermedades infecciosas han sido las vacunas (44). Sin embargo, en la actualidad no existe una vacuna aprobada para el tratamiento del VCHIK (45). No obstante, se han desarrollado estrategias experimentales que van encaminadas a re-

sultados importantes y concretos. Entre los diseños utilizados están las vacunas virales convencionales y las vacunas que recurren a herramientas de ingeniería genética recombinante (tabla 2).

La inmunidad protectora inducida por cada una de estas vacunas se cree que está asociada con la inducción de anticuerpos neutralizantes dirigidos hacia glicoproteínas de envoltura del virus, y aunque existen 4 linajes del VCHIK circulando mundialmente (linaje Oriente, Centro y Sur de África (ECSA), linaje de África Occidental, la cepa asiática y el linaje del Océano Índico (LIO)), todos los linajes parecen comprender un único serotipo, y diversos estudios han demostrado protección cruzada de larga duración entre los linajes, por lo que una sola vacuna debe ser suficiente para proteger contra todas las cepas CHIKV (46).

## Vacuna viva atenuada

Edelman y col. (47) utilizaron células MCR-5 para atenuar el VCHIK (cepa 181/clon 25) y desarrollaron una vacuna denominada TSI-GSD-218, la cual generó resultados positivos hasta estudios clínicos de fase II en 73 voluntarios sanos, y confirió al 98 % de los vacunados (59 personas) anticuerpos neutralizantes contra el virus, con permanencia de sueros seropositivos hasta de un año después de la inmunización y con pocos efectos secundarios (solo en un 8 % de los vacunados), exhibiendo así alta cobertura inmune, con una respuesta protectora importante y buena seguridad. Para los años posteriores, las investigaciones con esta vacuna se detuvieron y llevaron a la terminación de esta fase de estudio. Lo anterior debido a los cambios en la evaluación de las amenazas a las operaciones militares, junto con la baja incidencia de la enfermedad en ese

periodo(48). Años más tarde, la propagación del VCHIK en diferentes zonas de África y Asia en 2006 obligó a la reactivación de los esfuerzos por esta vacuna, la cual promete buenos resultados, complementada con los avances de las tecnologías actuales (48).

### **Vacuna muerta o inactiva**

Los primeros intentos de producción de una vacuna inactivada contra VCHIK se desarrollaron a finales de los años 60 y se preparó a partir de una cepa VCHIK genotipo asiático, la cual fue aislada en Tailandia en 1964. Aunque esta preparación mostró inicialmente resultados alentadores sin efectos adversos, inmunogénicamente no cumplió con las expectativas esperadas para pasar a estudios de fase clínica (49).

Recientemente Tiwari y col. (50) elaboraron un prototipo de vacuna preparando un cultivo de células Vero inactivado con formalina. En estos ensayos se utilizaron cepas del VCHIK implicados en la epidemia ocurrida en 2006 en India. El virus altamente purificado correspondía al subtipo ESCA. Los hallazgos encontrados sugieren que este prototipo de vacuna tiene muy buen potencial inmunogénico para neutralizar la infección del virus, y aumenta la respuesta inmunitaria tanto humoral como mediada por células, por lo cual sería un candidato prometedor, seguro y eficaz para una vacuna humana (50).

### **Vacunas vivas atenuadas-recombinantes**

Las vacunas vivas atenuadas para el VCHIK pueden ofrecer diferentes ventajas, entre las cuales sobresalen: relativa sencillez metodológica y una rápida protección con una sola dosis e inmunidad de larga duración. Lamentablemente, los enfoques tradicionales de atenuación pueden ser inestables, lo

cual lleva a eventos adversos después de la administración de la vacuna (47). Para evitar lo anterior se han desarrollado una serie de estrategias de atenuación genética para producir vacunas que conserven las ventajas de las vacunas vivas atenuadas y eviten los efectos adversos de la misma.

Un ejemplo de esto es la atenuación del clon infeccioso LR2006-OPY1 del VCHIK, mediante la eliminación de una gran parte del gen que codifica nsP3 (Mutante  $\Delta 5nsP3$ ) o la supresión de todo el gen que codifica la 6K (Mutante  $\Delta 6K$ ). Los estudios iniciales *in vitro* con esta metodología en ratones C57BL/6 revelaron una excelente estabilidad y perfil de atenuación. Estos candidatos con una sola inmunización ( $10^5$  pfu del CHIKV) provocaron altas concentraciones de anticuerpos neutralizantes, así como una fuerte activación de células T CD8. Posteriormente, en un segundo ensayo, los títulos de anticuerpos aumentaron, lo cual protegió a los animales de una alta viremia y evitó la inflamación en sus articulaciones (51).

Muy recientemente investigaciones apoyadas por el ICRES (Integrated Chikungunya Research) y diferentes centros de investigación de la Unión Europea entregaron resultados muy promisorios con respecto a un nuevo candidato a vacuna, basado en cepas de poxvirus, virus Vaccinia Ankara Modificado (MVA), la cual denominaron MVA-VCHIK (Virus Vaccinia Ankara-Chikungunya). Este nuevo candidato es una vacuna con un vector viral altamente atenuado, que expresa las proteínas de VCHIK (C, E3, E2, 6K, E1) y genes estructurales. El MVA-VCHIK con una sola dosis en modelos animales demostró ser altamente inmunogénico (52).

Weger-Lucarelli y col. (53) han descrito y caracterizado la construcción de un candidato a vacuna para el VCHIK, también utilizando cepas de virus Vaccinia Ankara Modificado,

que expresan glicoproteínas de envoltura E3 y E2 del VCHIK. En este estudio también se demuestra el potencial de MVA para expresar eficazmente proteínas del VCHIK y generar respuestas inmunes protectoras (53).

Otro aspirante promisorio con fuerte potencial como vacuna humana, para proteger contra la infección VCHIK y reducir su transmisión y propagación, son las candidatas IRES VCHIK (54). Este candidato a vacuna, además del virus vivo atenuado, utiliza un sitio de entrada de ribosoma interno del picornavirus (IRES); lo anterior para reducir la expresión de los genes de la proteína estructural VCHIK. Todos los modelos animales que se han expuesto a esta versión de la vacuna mostraron una protección significativa contra la viremia aguda y expresaron pocos cambios fisiológicos en comparación con los datos del grupo control de referencia (54).

### **Vacuna Sarampión-Chikungunya (VS-VCHIK)**

Esta vacuna recombinante utiliza genes del subtipo ESCA del VCHIK en cepas Schwartz de la vacuna contra sarampión. Inicialmente el efecto de esta vacuna se demostró en modelo con ratones, los cuales desarrollaron anticuerpos neutralizantes que confirieron una protección completa contra la infección por VCHIK (55). A comienzos de 2015 se obtuvieron resultados que demostraron la inmunogenicidad de esta vacuna contra el VCHIK en seres humanos sanos. Aunque aún es necesario comprobar su seguridad, tolerabilidad y protección en posteriores ensayos clínicos, estos resultados iniciales cimientan futuras investigaciones y la convierten en uno de los candidatos más prometedores y cercanos para combatir la infección por VCHIK (56).

### **Vacuna de partículas similares al virus (VLP)**

La inmunización con vacunas diseñadas de partículas similares al virus de alfavirus (*virus-like particles*, VLPs) representa una importante estrategia para detener la propagación de VCHIK. Este diseño está constituido por virus que contienen proteínas inductoras de inmunidad, mas no contienen el material genético necesario para la multiplicación viral, por lo tanto, este mecanismo permite promover una protección humoral de alto grado y de bajo riesgo (57).

Los primeros resultados prometedores con esta vacuna se obtuvieron de trabajos con primates no humanos, los cuales al ser inoculados con VLPs se les estimuló la producción de anticuerpos neutralizantes contra proteínas de la envoltura de diferentes cepas VCHIK (58).

Posteriormente, en un estudio de fase I en 25 individuos voluntarios sanos, a los cuales se les suministró tres inyecciones de pseudopartículas virales en diferentes dosis, se obtuvieron resultados prometedores al conseguir un producto seguro, bien tolerado, altamente inmunogénico y fácil de producir (59).

En ese trabajo los VLPs fueron producidos por la transfección de células VRC293 con un plásmido de ADN que codifica los genes estructurales del virus chikungunya en un riñón embrionario humano.

El próximo paso con respecto a esta vacuna es probarla en individuos constantemente expuestos al VCHIK en zonas endémicas (59).

## Vacunas de ADN

Estos estudios se fundamentan en la producción de ADN sintético con capacidad de expresar glicoproteínas del VCHIK, para posterior utilización en ensayos de neutralización viral (60).

En 2008, Muthumani y col. (61) utilizaron la técnica de electroporación de corriente constante, para inmunizar ratones C57BL/6, con una inyección intramuscular de plásmido codificante para las proteínas de cápside, E1 y E2 del VCHIK. En este estudio se determinó que los inmunógenos sintéticos inoculados son capaces de inducir títulos altos de anticuerpos capaces de reconocer antígeno nativo y también de generar considerable respuesta celular *in vivo* (61).

Partiendo de este trabajo, posteriormente Mallilankaraman y col. (60), aparte de medir la eficacia de esta molécula de ADN sintético en ratones, también estudiaron la posibilidad de generar niveles protectores de respuesta inmune en primates no humanos. Los investigadores diseñaron una molécula que inducía mayor producción de anticuerpos neutralizantes, designada como pMCE321, que fue una modificación optimizada de la vacuna utilizada por Muthumani y col., y derivada de una nueva cepa aislada del VCHIK denominada PC-08.

Los datos obtenidos de los ratones y primates inmunizados con la vacuna pMCE321 indicaron que origina una fuerte respuesta celular, la cual es mediada por células T CD8<sup>+</sup>, así como una respuesta humoral con altos títulos de IgG neutralizante. Estos datos son similares a los niveles observados en seres humanos durante una infección por VCHIK activo (60).

## Vacunas quimeras

Estas vacunas son producidas mediante sustitución de genes del VCHIK, con genes similares pertenecientes a virus de la misma familia de Alfavirus.

En 2008, Wang y col. (62) diseñaron diferentes modelos para vacuna de VCHIK basados en este enfoque quimérico. Recurriendo a tecnología de ADN recombinante utilizaron cepas atenuadas de la encefalitis equina venezolana (VEEV), virus de la encefalitis equina oriental (VEEE) y cepas de virus Sindbis (VSIN) como molde estructural, las cuales fueron complementadas con genes de las proteínas estructurales de VCHIK (VEEV / VEEE-CHIKV).

Este diseño fue dirigido para promover la replicación más eficaz del genoma viral, la transcripción del RNA subgenómico, la traducción eficiente de proteínas estructurales y además conocer su capacidad inmunogénica.

Aunque algunos resultados mostraron una presencia importante de potencial neutralizante contra la infección en modelos murinos con una sola dosis, no se determinó la dosis exacta necesaria para lograr la inmunidad y protección adecuada contra la exposición, lo cual hace necesario investigaciones complementarias (62).

Chattopadhyay y col. (63) han reportado trabajos de construcción de vacunas experimentales quimeras para el VCHIK, basados en el virus de la estomatitis vesicular (VSV), con capacidad de expresar poliproteína del virus VCHIK (E3-E2-6K-E1), en lugar de su glicoproteína G (vacuna nombrada como VSV-ΔG).

Los resultados obtenidos indican que los títulos generados de anticuerpos neutralizantes a raíz de la inmunización de una sola dosis con el vector VSV $\Delta$ G-CHIKV fueron comparables a los reportados para las quimeras VEEV/VEEE-CHIKV (63), lo cual fundamenta su uso y posteriores ensayos.

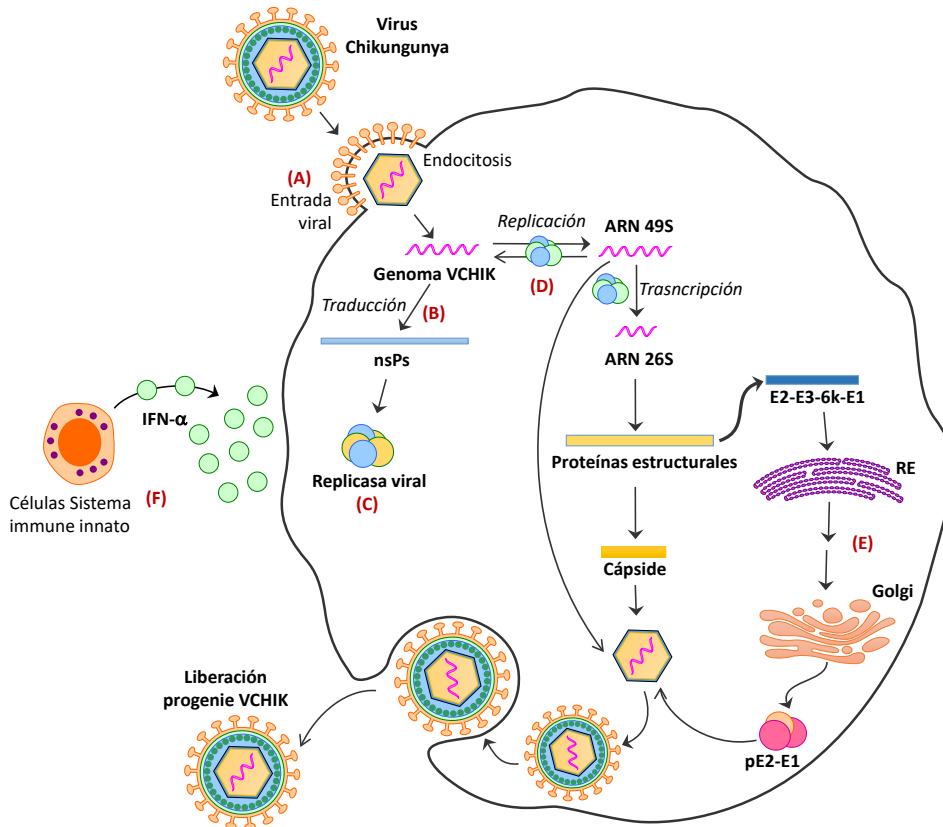
Este candidato quimera vector VSV  $\Delta$ G podría servir como un modelo general para la construcción de vacunas para la familia de alfa virus, por su alta capacidad de incorporar de manera eficiente glicoproteínas diferentes a las propias y por la robustez de la respuesta inmune que produce. Sin embargo, es necesario seguir realizando estudios de seguridad, que comprueben que la vacuna no genera efectos adversos derivados de su administración (63).

### **Vacuna con subunidad E2 recombinante e inactivada**

Kumar y col. (64) desarrollaron un modelo que emplea cepas del genotipo ESCA. Inicialmente purificaron y expresaron los genes que codifican la proteína E2 del VCHIK, para después utilizar el virus completo inactivado químicamente con formalina o  $\beta$ -propionolactona (BLP). Además usaron adyuvantes (alumbre) para comparar la eficacia de la vacuna en diferentes grupos evaluados.

El modelo produjo una equilibrada respuesta de Th1/Th2 con anticuerpos neutralizantes del virus en ratones BALB/C.

Los títulos de anticuerpos en cada modelo fueron dependientes de la dosis para todas las formulaciones del inmunógeno, y se resalta la continua protección a la exposición del virus 5 meses después de las segundas dosis (64).



Fuente: propia de autores.

**Figura 1.** Ciclo de replicación del VCHIK en las células infectadas y sitios de acción de compuestos antivirales. Los compuestos antivirales en fase de estudio hasta la fecha se han clasificado en los siguientes mecanismos de acción: inhibidores de la entrada viral (A), inhibidores de la traducción de proteínas virales (B), inhibidores de la replicasa viral (C), inhibidores de la replicación del genoma viral (D), Inhibidores de la maduración de las glicoproteínas virales (E) y moduladores de la respuesta inmune del huésped (F). Virus chikungunya (VCHIK), Proteínas no estructurales virales (nsPs), Reticulo endoplásmico (RE), Interferon (IFN).

**Tabla 1.** Compuestos prometedores con actividad inhibidora frente a VCHIK

Compuesto	Tipo de ensayo/huésped VCHIK	Referencias
<b>Inhibidores de la entrada viral</b>		
Cloroquina	<i>In vitro</i> (células vero)	(13)
Arbidol	<i>In vitro</i> (células vero)	(17)
Derivados 10H-fenotiazinas	<i>In vitro</i> (células BHK)	(19)
<b>Inhibidores de la replicasa viral</b>		
Derivados 5,7 dihidroflavonas	<i>In vitro</i> (células BHK)	(19)
Protipendilo	<i>In vitro</i> (células BHK)	(19)
Trigocherrinas y Trigocherriolidos	<i>In vitro</i> (células vero)	(21)
ID1452-2 y análogos	<i>In vitro</i> (células HEK-293T)	(22)
(Compuesto 1) porción activa de 3,4-dietoxifenilo	<i>Cribado virtual</i> (nsP2 VCHIK) <i>In vitro</i> (células vero)	(23)

Continúa...

Compuesto	Tipo de ensayo/huésped VCHIK	Referencias
<b>Inhibidores de la replicación del genoma viral</b>		
Ribavirina	<i>In vitro</i> (células vero)	(25)
6-Azauridina	<i>In vitro</i> (células vero)	(25)
Ácido micofenólico	<i>In vitro</i> (células vero)	(30)
<b>Inhibidores de la traducción de proteínas virales</b>		
siRNA	<i>In vitro</i> (frente a nsP3 y E1)	(31)
shRNA	<i>In vitro</i> (células Hela y BHK)	(32)
Harringtonina	<i>In vitro</i> (células BHK)	(34)
<b>Inhibidores de la maduración de las glicoproteínas virales</b>		
Decanoil-RVKKR-clorometil cetona	<i>In vitro</i> (células LHCN-M2)	(36)
<b>Moduladores de la respuesta inmune del huésped</b>		
IFN-	<i>In vitro</i> (células vero)	(25)
Ácido Poli (I:C)	<i>In vitro</i> (células vero)	(41)

Fuente: Datos tabulados por los autores.

**Tabla 2.** Principales vacunas candidatos contra la infección por virus chikungunya

Convencional	Diseño vacuna	Fase	Referencia
TSI-GSD-218	Viva atenuada	Clínica fase II	(47)
VCHIK-ESCA	Inactiva con formalina	Pre clínica	(50)
No convencionales	Diseño vacuna	Fase	Referencia
VS-VCHIK	Viva atenuada recombinante	Clínica fase I	(56)
VLP	Recombinante-Transfucción de células HEK 293	Clínico fase I	(59)
MVA-VCHIK	Viva atenuada-recombinante	Preclínica	(52)
VCHIK IRES	Viva atenuada-recombinante	Preclínica	(54)
ADN VCHIK	ADN sintético	Preclínica	(60)
VEEV/VEEE/VCHIK	Quimera-recombinante	Preclínica	(62)
VSV G-VCHIK	Quimera-recombinante	Preclínica	(63)
E2 recombinante	Subunidad E2-recombinante-	Preclínica	(64)

Fuente: Datos tabulados por los autores.

## CONCLUSIÓN

Después de su importante reaparición en 2005, el VCHIK se ha extendido rápidamente en diferentes países en todo el mundo, convirtiéndose en una seria amenaza para la salud pública.

Actualmente no existe una vacuna con licencia disponible ni un tratamiento espe-

cífico para esta enfermedad. Sin embargo, la utilización de herramientas moleculares, genéticas y bioinformáticas han acelerado la identificación de nuevos candidatos a fármacos y vacunas. Los estudios hechos hasta el momento con posibles candidatos farmacológicos muestran inicialmente resultados promisorios. Por lo tanto, es necesaria una cuidadosa evaluación que sostenga la efectividad de estos compuestos y valore

sus posibles efectos adversos para futuros ensayos en humanos.

**Agradecimientos:** A la Vicerrectoría de Investigaciones en el Plan de Fortalecimiento de Grupos de Investigación reconocidos por Colciencias.

**Conflicto de intereses:** ninguno.

**Financiación:** Universidad de Cartagena.

## REFERENCIAS

1. Powers AM, Brault AC, Shirako Y, Strauss EG, Kang W, Strauss JH et al. Evolutionary Relationships and Systematics of the Alphaviruses. *Journal of Virology* 2001;75(21):10118-31.
2. Coffey LL, Failloux A-B, Weaver SC. Chikungunya Virus-Vector Interactions. *Viruses* 2014;6(11):4628-63.
3. Couderc Trs, Lecuit M. Chikungunya virus pathogenesis: From bedside to bench. *Antiviral Research* 2015;121:120-31.
4. Horcada ML, Diaz-Calderon C, Garrido L. Chikungunya Fever. Rheumatic Manifestations of an Emerging Disease in Europe. *Reumatología Clínica (English edition)* 2015; 11(3):161-4. (se corrigió)
5. Foissac M, Javelle E, Ray S, Guarín B, Simon F. Post-Chikungunya Rheumatoid Arthritis, Saint Martin. *Emerging Infectious Diseases* 2015;21(3):530-2.
6. Arpino C, Curatolo P, Rezza G. Chikungunya and the nervous system: what we do and do not know. *Rev Med Virol* 2009 May;19(3):121-9.
7. Lewthwaite P, Vasanthapuram R, Osborne JC, Begum A, Plank JL, Shankar MV et al. Chikungunya virus and central nervous system infections in children, India. *Emerg Infect Dis* 2009 Feb;15(2):329-31.
8. Weaver SC, Forrester NL. Chikungunya: Evolutionary history and recent epidemic spread. *Antiviral Research* 2015;120:32-9.
9. OMS. Chikungunya. 2015 [fecha de acceso: 29 de julio 2015 de 2015]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs327/en/>.
10. Thiberville SD, Moyon N, Dupuis-Maguiraga L, Nougaiere A, Gould EA, Roques P et al. Chikungunya fever: epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. *Antiviral Res* 2013 Sep;99(3):345-70.
11. Bettadapura J, Herrero LJ, Taylor A, Mahalingam S. Approaches to the treatment of disease induced by chikungunya virus. *Indian J Med Res* 2013 Nov;138(5):762-5.
12. Kaur P, Chu JJ. Chikungunya virus: an update on antiviral development and challenges. *Drug Discov Today* 2013 Oct;18(19-20):969-83.
13. Khan M, Santhosh SR, Tiwari M, Lakshmana Rao PV, Parida M. Assessment of in vitro prophylactic and therapeutic efficacy of chloroquine against Chikungunya virus in vero cells. *J Med Virol* 2010 May;82(5):817-24.
14. Savarino A, Lucia MB, Rastrelli E, Rutella S, Golotta C, Morra E et al. Anti-HIV effects of chloroquine: inhibition of viral particle glycosylation and synergism with protease inhibitors. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004 Mar 1;35(3):223-32.
15. Brighton SW. Chloroquine phosphate treatment of chronic Chikungunya arthritis. An open pilot study. *S Afr Med J* 1984 Aug 11;66(6):217-8.
16. Boriskin YS, Pecheur EI, Polyak SJ. Arbidol: a broad-spectrum antiviral that inhibits acute and chronic HCV infection. *Virol J* 2006;3:56.
17. Delogu I, Pastorino B, Baronti C, Nougaiere A, Bonnet E, de Lamballerie X. In vitro antiviral activity of arbidol against Chikungunya virus and characteristics of a selected resistant mutant. *Antiviral Res* 2011 Jun;90(3):99-107.
18. Liu MY, Wang S, Yao WF, Wu HZ, Meng SN, Wei MJ. Pharmacokinetic properties and bioequivalence of two formulations of

- arbidol: an open-label, single-dose, randomized-sequence, two-period crossover study in healthy Chinese male volunteers. *Clin Ther* 2009 Apr;31(4):784-92.
19. Pohjala L, Utt A, Varjak M, Lulla A, Merits A, Ahola T et al. Inhibitors of alphavirus entry and replication identified with a stable Chikungunya replicon cell line and virus-based assays. *PLoS One* 2011;6(12):e28923.
  20. Weng CJ, Yen GC. Flavonoids, a ubiquitous dietary phenolic subclass, exert extensive in vitro anti-invasive and in vivo anti-metastatic activities. *Cancer Metastasis Rev* 2012 Jun;31(1-2):323-51.
  21. Allard PM, Leyssen P, Martin MT, Bourjot M, Dumontet V, Eydoux C et al. Antiviral chlorinated daphnane diterpenoid orthoesters from the bark and wood of *Trigonostemon cherrieri*. *Phytochemistry* 2012 Dec;84:160-8.
  22. Lucas-Hourani M, Lupan A, Despres P, Thoret S, Pamlard O, Dubois J et al. A phenotypic assay to identify Chikungunya virus inhibitors targeting the nonstructural protein nsP2. *J Biomol Screen* 2013 Feb;18(2):172-9.
  23. Bassetto M, De Burghgraeve T, Delang L, Massarotti A, Coluccia A, Zonta N et al. Computer-aided identification, design and synthesis of a novel series of compounds with selective antiviral activity against chikungunya virus. *Antiviral Res* 2013 Apr;98(1):12-8.
  24. Graci JD, Cameron CE. Mechanisms of action of ribavirin against distinct viruses. *Rev Med Virol* 2006 Jan-Feb;16(1):37-48.
  25. Briolant S, Garin D, Scaramozzino N, Jouan A, Crance JM. In vitro inhibition of Chikungunya and Semliki Forest viruses replication by antiviral compounds: synergistic effect of interferon-alpha and ribavirin combination. *Antiviral Res* 2004 Feb;61(2):111-7.
  26. Ravichandran R, Manian M. Ribavirin therapy for Chikungunya arthritis. *J Infect Dev Ctries* 2008;2(2):140-2.
  27. Rada B, Dragun M. Antiviral action and selectivity of 6-azauridine. *Ann N Y Acad Sci* 1977 Mar 4;284:410-7.
  28. Klein RJ, Friedman-Kien AE, Brady E. Herpes simplex virus skin infection in hairless mice: treatment with antiviral compounds. *Antimicrob Agents Chemother* 1974 Mar;5(3):318-22.
  29. Lipsky JJ. Mycophenolate mofetil. *Lancet* 1996 Nov 16;348(9038):1357-9.
  30. Khan M, Dhanwani R, Patro IK, Rao PV, Parida MM. Cellular IMPDH enzyme activity is a potential target for the inhibition of Chikungunya virus replication and virus induced apoptosis in cultured mammalian cells. *Antiviral Res* 2011 Jan;89(1):1-8.
  31. Dash PK, Tiwari M, Santhosh SR, Parida M, Lakshmana Rao PV. RNA interference mediated inhibition of Chikungunya virus replication in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008 Nov 28;376(4):718-22.
  32. Lam S, Chen KC, Ng MM, Chu JJ. Expression of plasmid-based shRNA against the E1 and nsP1 genes effectively silenced Chikungunya virus replication. *PLoS One* 2012;7(10):e46396.
  33. Karagiannis TC, El-Osta A. RNA interference and potential therapeutic applications of short interfering RNAs. *Cancer Gene Ther* 2005 Oct;12(10):787-95.
  34. Kaur P, Thiruchelvan M, Lee RC, Chen H, Chen KC, Ng ML et al. Inhibition of chikungunya virus replication by harringtonine, a novel antiviral that suppresses viral protein expression. *Antimicrob Agents Chemother* 2013 Jan;57(1):155-67.
  35. Voss JE, Vaney MC, Duquerroy S, Vornrhein C, Girard-Blanc C, Crublet E et al. Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography. *Nature* 2010 Dec 2;468(7324):709-12.
  36. Ozden S, Lucas-Hourani M, Ceccaldi PE, Basak A, Valentine M, Benjannet S et al. Inhibition of Chikungunya virus infection in cultured human muscle cells by furin inhibitors: impairment of the maturation of the E2 surface glycoprotein. *J Biol Chem* 2008 Aug 8;283(32):21899-908.

37. Schwartz O, Albert ML. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. *Nat Rev Microbiol* 2010 Jul;8(7):491-500.
38. De Veer MJ, Holko M, Frevel M, Walker E, Der S, Paranjape JM et al. Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. *J Leukoc Biol* 2001 Jun;69(6):912-20.
39. Couderc T, Chretien F, Schilte C, Disson O, Brigitte M, Guivel-Benhassine F et al. A Mouse Model for Chikungunya: Young Age and Inefficient Type-I Interferon Signaling Are Risk Factors for Severe Disease. *PLoS Pathogens* 2008;4(2):e29.
40. Bordi L, Meschi S, Selleri M, Lalle E, Castilletti C, Carletti F et al. Chikungunya virus isolates with/without A226V mutation show different sensitivity to IFN- $\alpha$ , but similar replication kinetics in non human primate cells. *New Microbiol* 2011 Jan;34(1):87-91.
41. Li YG, Siripanyaphinyo U, Tumkosit U, Noranate N, A AN, Pan Y et al. Poly (I:C), an agonist of toll-like receptor-3, inhibits replication of the Chikungunya virus in BEAS-2B cells. *Virol J* 2012;9:114.
42. Priya R, Patro IK, Parida MM. TLR3 mediated innate immune response in mice brain following infection with Chikungunya virus. *Virus Research* 2014;189:194-205.
43. Field AK, Tytell AA, Lampson GP, Hilleman MR. Inducers of interferon and host resistance. II. Multistranded synthetic polynucleotide complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1967 Sep;58(3):1004-10.
44. Plotkin SA. Vaccines: past, present and future. *Nat Med* 2005.
45. Weaver SC, Osorio JE, Livengood JA, Chen R, Stinchcomb DT. Chikungunya virus and prospects for a vaccine. *Expert review of vaccines* 2012;11(9):1087-101.
46. Smalley C, Erasmus JH, Chesson CB, Beasley DWC. Status of research and development of vaccines for chikungunya. *Vaccine* 2016;34(26):2976-81.
47. Edelman R, Tacket CO, Wasserman SS, Bodison SA, Perry JG, Mangiafico JA. Phase II safety and immunogenicity study of live chikungunya virus vaccine TSI-GSD-218. *Am J Trop Med Hyg* 2000 Jun;62(6):681-5.
48. Hoke Jr CH, Pace-Templeton J, Pittman P, Malinoski FJ, Gibbs P, Ulderich T et al. US Military contributions to the global response to pandemic chikungunya. *Vaccine* 2012;30(47):6713-20.
49. Harrison VR, Eckels KH, Bartelloni PJ, Hampton C. Production and evaluation of a formalin-killed Chikungunya vaccine. *J Immunol* 1971 Sep;107(3):643-7.
50. Tiwari M, Parida M, Santhosh SR, Khan M, Dash PK, Rao PVL. Assessment of immunogenic potential of Vero adapted formalin inactivated vaccine derived from novel ECSA genotype of Chikungunya virus. *Vaccine* 2009;27(18):2513-22.
51. Hallengard D, Kakoulidou M, Lulla A, Kummerer BM, Johansson DX, Mutso M et al. Novel Attenuated Chikungunya Vaccine Candidates Elicit Protective Immunity in C57BL/6 mice. *Journal of Virology* 2014;88(5):2858-66.
52. Garcia-Arriaza J, Cepeda V, Hallengard D, Sorzano CoS, Kummerer BM, Liljestrom P et al. A Novel Poxvirus-Based Vaccine, MVA-CHIKV, Is Highly Immunogenic and Protects Mice against Chikungunya Infection. *Journal of Virology* 2014;88(6):3527-47.
53. Weger-Lucarelli J, Chu H, Aliota MT, Partidos CD, Osorio JE. A Novel MVA Vectored Chikungunya Virus Vaccine Elicits Protective Immunity in Mice. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2014;8(7):e2970.
54. Roy CJ, Adams AP, Wang E, Plante K, Gorchakov R, Seymour RL et al. Chikungunya Vaccine Candidate Is Highly Attenuated and Protects Nonhuman Primates Against Telemetrically Monitored Disease Following a Single Dose. *The Journal of Infectious Diseases* 2014;209(12):1891-9.
55. Brandler S, Ruffie C, Combredet C, Brault J-B, Najburg V, Prevost M-C et al. A recombinant measles vaccine expressing chikungunya virus-like particles is strongly immunogenic and protects mice from lethal

- challenge with chikungunya virus. *Vaccine* 2013;31(36):3718-25.
56. Ramsauer K, Schwameis M, Firbas C, Mullner M, Putnak RJ, Thomas SJ et al. Immunogenicity, safety, and tolerability of a recombinant measles-virus-based chikungunya vaccine: a randomised, double-blind, placebo-controlled, active-comparator, first-in-man trial. *The Lancet Infectious Diseases* 2015;15(5):519-27.
  57. Noranate N, Takeda N, Chetanachan P, Sittisaman P, A-nuegoonpipat A, Anantapreecha S. Characterization of Chikungunya Virus-Like Particles. *PLoS ONE* 2014;9(9):e108169.
  58. Akahata W, Yang Z-y, Andersen H, Sun S, Holdaway HA, Kong W-P et al. A VLP vaccine for epidemic Chikungunya virus protects non-human primates against infection. *Nature medicine* 2010;16(3):334-8.
  59. Chang L-J, Dowd KA, Mendoza FH, Saunders JG, Sitar S, Plummer SH et al. Safety and tolerability of chikungunya virus-like particle vaccine in healthy adults: a phase 1 dose-escalation trial. *The Lancet* 2014/12/12/;384(9959):2046-52.
  60. Mallilankaraman K, Shedlock DJ, Bao H, Kawalekar OU, Fagone P, Ramanathan AA et al. A DNA vaccine against chikungunya virus is protective in mice and induces neutralizing antibodies in mice and nonhuman primates. *PLoS Negl Trop Dis* 2011;5(1):e928.
  61. Muthumani K, Lankaraman KM, Laddy DJ, Sundaram SG, Chung CW, Sako E et al. Immunogenicity of novel consensus-based DNA vaccines against chikungunya virus. *Vaccine*. 2008;26(40):5128-34.
  62. Wang E, Volkova E, Adams AP, Forrester N, Xiao S-Y, Frolov I et al. chimeric alphavirus vaccine candidates for chikungunya. *Vaccine* 2008;26(39):5030-9.
  63. Chattopadhyay A, Wang E, Seymour R, Weaver SC, Rose JK. A Chimeric Vesiculo/Alphavirus Is an Effective Alphavirus Vaccine. *Journal of Virology* 2013;87(1):395-402.
  64. Kumar M, Sudeep AB, Arankalle VA. Evaluation of recombinant E2 protein-based and whole-virus inactivated candidate vaccines against chikungunya virus. *Vaccine* 2012;30(43):6142-9.