SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO4

No. 14-237334- -00000-0000

Fecha: 2014-10-27 15:57:22 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 49

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-069004- -00011-0000

Fecha: 2014-10-27 15:57:22 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 49

DIRECCIÓN DE NUEV
CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y F

1. Identificación del Tramite

☐ **Conversión** ☑ **División** ☐ **Fusión**

☑ Patente de Invención
☐ Patente de Modelo de Utilidad
☐ Registro de Diseño Industrial
☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2. Datos del solicitante

Persona Natural ☐ Persona Jurídica ☑

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
Nombre o denominación / Nombre o razón social

Nombre del representante legal

Tipo de empresa Micro ☐ Pequeña ☐ Mediana ☐ Otra ☐

Documento de identificación: ☐C.C. ☐C.E. ☐NIT ☐Otro Número _____

Nacionalidad/País de constitución	Dirección del titular		Ciudad
BRASIL	AVENIDA BRASIL 4365, MANGUINHOS 21045-900, RIO DE JANEIRO		RIO DE JANEIRO
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico	

☐ **Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico**

3. Datos del apoderado:

Apellidos y Nombre	Documento de identificación	Tarjeta profesional
URIBE RESTREPO JUAN CARLOS	C.C 79.159.313	54.493

Dirección y domicilio		Ciudad
CALLE 93B No. 12-48, Piso 4o. BOGOTA, D.C., COLOMBIA		BOGOTÁ. D.C. COLOMBIA
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
tum@tumnet.com	6-114209	6-019660

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general _____

4. Datos del trámite

CONVERSION	DIVISION	FUSION
Expediente	Expediente 12-069004	Expediente
De:	De: 1 SOLICITUD	De:
A:	A: 2 SOLICITUDES	A:

5. Comprobante de Pago No _____ **Fecha** DD / MM / AA

6. Anexos

- [x] Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación
- [ ] Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación REPOSA EN EL EXPEDIENTE.
- [ ] Número de documento que ordena la comisión o fusión o división
- [x] Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud
- [ ] Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético

7. Firma	
JUAN CARLOS URIBE RESTREPO	
Nombre y apellidos	Firma
C.C 79.159.313	Tarjeta Profesional 54493

PLÁSMIDO RECOMBINANTE CODIFICANDO LA PROTEÍNA DEL SOBRE VIRAL E POR CADA SEROTIPO DEL VIRUS DEL DENGUE

Campo de la Invención

La presente invención se refiere a un método para inducir una respuesta inmune contra virus de la dengue basado en vacunas de ADN y virus quiméricos 17D en inmunizaciones combinadas o coadministradas. También están dentro del objeto de la presente invención vacunas de ADN contra los cuatro serotipos del virus dengue a partir de la construcción de distintos plásmidos recombinantes conteniendo el gen que codifica la proteína E, o solamente la secuencia que corresponde al dominio III de esta proteína, a partir de cada serotipo viral del virus dengue (DENV1-4).

Está incluida en el objeto de protección una composición vacunal consistiendo de:

(a) vacunas de ADN contra los cuatro serotipos del virus dengue a partir de la construcción de distintos plásmidos recombinantes conteniendo los genes de las proteínas E a partir de cada serotipo viral del virus dengue, o solamente las secuencias que corresponden al dominio III de estas proteínas, todas fundidas a la secuencia que codifica el péptido señal del activador del plasminogeno de tejido humano (t-PA);

(b) virus quiméricos comprendiendo el virus vacunal de fiebre amarilla 17D modificado, por la tecnología de obtención de clon infeccioso, con la sustitución de las secuencias que codifican las proteínas prM y E de fiebre amarilla por las secuencias que codifican las proteínas prM y E de los virus dengue de los distintos serotipos; y

(c) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La invención está relacionada también a un conjunto comprendiendo (a) vacunas de ADN contra los cuatro serotipos

del virus dengue a partir de la construcción de distintos plásmidos recombinantes conteniendo los genes que codifican las proteínas E a partir de cada serotipo viral del virus dengue, o solamente las secuencias que corresponden al dominio III de estas proteínas, todas fundidas a la secuencia que codifica el péptido señal del activador de plasminogeno de tejido humano (t-PA); y (b) virus quiméricos comprendiendo el virus vacunal de fiebre amarilla 17D modificado, por la tecnología de obtención de clon infeccioso, con la sustitución de las secuencias que codifican las proteínas prM y E de fiebre amarilla por las secuencias que codifican las proteínas prM y E de los virus dengue de los distintos serotipos.

Fundamentos de la Invención

La dengue se considera uno de los principales problemas de salud pública mundial, entre las enfermedades causadas por parvovirus, debido a su importancia en términos de morbilidad y mortalidad en la población humana, principalmente en las regiones tropicales y subtropicales. Su agente etiológico es el virus de la dengue, que es transmitido por el mosquito del género *Aedes*, generalmente *Aedes aegypti*.

El virus de la dengue (DENV) pertenece al género Flavivirus, de la familia Flaviviridae. Hay 4 tipos de virus antigénicamente y serológicamente distintos, DENV1, DENV2, DENV3 y DENV4. Aunque la infección primaria por el virus de la dengue induzca una inmunidad al serotipo infectante, no hay una protección cruzada de larga duración contra los otros serotipos virales, sucediendo infecciones secuenciales con los distintos virus de la dengue.

El virus de la dengue está compuesto por un sobre viral y un nucleocapsideo acomplejado a una molécula de ARN. Su genoma es de aproximadamente 10.700 nucleótidos y está constituido por una cinta simple de ARN con polaridad

positiva que codifica la poliproteína precursora de las proteínas flavivirales. Este precursor está clivado por proteasas celulares y por la proteasa viral generando tres proteínas estructurales , C (capsideo), prM (pre membrana) y E (sobre), y siete proteínas no estructurales, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5. Las proteínas estructurales traducidas se incorporan a los virions infecciosos maduros, mientras las proteínas no estructurales están involucradas en la replicación y montaje del virus.

La proteína E (Sobre) del virus de la dengue es una proteína estructural y transmembrana, siendo glucosilada en casi todos los Flavivirus. Esta proteína E se destaca como el mayor componente glicoproteico presente en la superficie de esos virus, teniendo un peso molecular de 55 a 60 kDa, constituida por 493 a 501 aminoácidos.

La proteína E está asociada a numerosas actividades biológicas importantes. La proteína E actúa como proteína ligante, interactuando con receptores presentes en la superficie celular y mediante la fusión de la membrana del virus a la membrana de la célula hospedera. Esa proteína también está relacionada a la disociación del nucleocapsideo y desempeña un importante papel en la virulencia del virus. Además, la proteína E es un fuerte inmunógeno, generando altos niveles de anticuerpos en pacientes infectados con el virus, que pueden ser neutralizantes, ligándose a epítopos que interactúan con receptores celulares e impidiendo, por lo tanto, la entrada del virus en las células del hospedero (Chang, 1997; Kinney & Hung, 2001).

La proteína E está formada por un dímero alargado que se extiende paralelamente a la membrana del virus. Cada monómero está compuesto por tres dominios: I, II y III. El dominio I es central, constituido por 120 residuos de aminoácidos: 1-51, 133-193, 279-296. El dominio II es alargado, abarca la

región donde los dos monómeros están ligados en varios puntos en la molécula, formando el dímero. El dominio II está constituido por los siguientes residuos de aminoácidos: 52-132, 194-280. El dominio III está localizado en la porción carboxiterminal, se presenta como una inmunoglobulina, cuya función es ligarse a receptores celulares, como, por ejemplo, DC-SIGN presente en las células dendríticas inmaturas. La ligación virus / célula mediada por el dominio III promueve la endocitosis de la partícula viral. El dominio III está constituido por los residuos de aminoácidos: 298-394. Los epítopos presentes en esa región son capaces de inducir una respuesta de anticuerpos neutralizantes tipo y subtipo específico.

Diversas vacunas han sido propuestas para el combate a la dengue, pero, sin embargo, ninguno de los abordajes sugeridos presentó las características necesarias para una vacunación en masa, como seguridad, y una respuesta inmune protectora de largo plazo contra los distintos serotipos virales circulantes.

Una de las principales dificultades es construir un prototipo de vacunas conteniendo componentes que induzcan una inmunidad protectora contra los cuatro serotipos de virus de la dengue, sin generar consecuencias como la fiebre hemorrágica, y utilizando el menor número posible de dosis.

Esfuerzos considerables han sido realizados para el desarrollo de la vacuna tetravalente atenuada. El más prometedor de estos candidatos consiste en virus atenuados por pasos en cultura de células. Esta vacuna está en fase de evaluaciones clínicas, pero, sin embargo, ya se observaron algunas complicaciones. Además, existe el riesgo potencial de infecciones serias por virus que puedan surgir de reversiones génicas o recombinaciones, haciendo con que sea difícil formular una vacuna viva atenuada multivalente debido a la

posibilidad de interferencia homóloga o heteróloga durante la replicación viral (Barrett, 2001; Kinney & Huang, 2001).

Otra estrategia que se utiliza para el desarrollo de una vacuna contra el virus de la dengue es la construcción de quimeras. Esa tecnología se ha utilizado en diversas investigaciones de vacunas contra Flavivirus, incluyendo el virus de la Dengue (Galler et al, 2005).

A pesar de los avances que se han obtenido hasta este momento, todavía existe un gran desafío: producir una vacuna capaz de generar una respuesta homogénea contra los cuatro serotipos del virus de la Dengue.

La vacuna de ADN representa una eficiente tecnología en el desarrollo de vacunas para el control de agentes infecciosos. Esta técnica comprende la inoculación de un plásmido de expresión eucariótico conteniendo el antígeno de interés, que es sintetizado *in vivo* por las células del organismo inoculado y lo presentan los complejos de histocompatibilidad I y II (MHC I y II), activando una inmunidad específica. La expresión endógena del antígeno por las células hospederas parece que simula una infección viral natural, siendo capaz de generar tanto una respuesta inmune humoral, con la producción de anticuerpos, como una respuesta celular, con la inducción de linfocitos T citotóxicos. La inducción de estas dos formas de respuesta inmune proporciona ventajas en comparación a las vacunas de subunidades, que producen, principalmente, o exclusivamente, una respuesta de anticuerpos, y se compara a la respuesta celular de vacunas vivas atenuadas, sin presentar el riesgo de reversión para forma patogénica del agente infeccioso. Además, las vacunas de ADN son estables a variaciones de temperatura, de menor costo para la producción en gran escala y permiten una rápida selección de secuencias a evaluar.

Recientemente, varios grupos han analizado el uso de la

vacuna de ADN en el control de flavivirus. Algunos de estos estudios con distintos virus de esta familia han demostrado la inducción de una respuesta inmune protectora flavivirus-específica en ratones y primates no humanos tras la vacunación con plásmidos codificando las proteínas flavivirales prM y E (Phillpotts et al., 1996; Kochel et al, 1997); Raviprakash et al, 2000). Algunos análisis también se realizaron utilizando vacunas de ADN conteniendo los genes de proteínas no estructurales de flavivirus, como: el virus de la encefalitis japonesa, hepatitis C y dengue (Lin et al., 1998; Encke et al., 1998; Wu et al., 2003; Costa et al., 2006, 2007).

Estudios recientes demostraron que vacunas ADN conteniendo la secuencia completa de los genes que codifican las proteínas prM y E y la región del dominio III del virus DENV1-4 fueron capaces de inducir una respuesta inmune humoral con la presencia de anticuerpos contra Dengue en modelos murrinos. Sin embargo, en estos estudios el potencial protector de vacunas de ADN se evaluó solamente indirectamente (seroneutralización y respuesta celular) sin que se realizaran tests de desafíos directos con dosis letales del virus de la Dengue para evaluar la eficacia de esas vacunas (Chen et al, 2007). Algunas vacunas de ADN contra dengue se probaron en primates no humanos *Aotus Rhesus*) y proporcionaron protección parcial, evaluada por medio de la viremia en los animales desafiados con el virus de la Dengue (Raviprakash et al., 2000; Puntak et al., 2003; Blair et al., 2006).

En lo que se refiere al método de inmunización, los presentes inventores destacan que Putnak y colaboradores (2003) construyeron una vacuna ADN conteniendo los genes que codifican las proteínas prM y E a partir del DENV2, observaron la inmunogenicidad de la misma en ratones e

inmunizaron enseguida a monos Rhesus. Sin embargo, fueron necesarias varias dosis de la vacuna para la inducción de una respuesta protectora y de corta duración. Siete meses después de las inmunizaciones, los animales no se mostraron más protegidos contra desafíos con el virus de la dengue. Así siendo, podemos observar que estos estudios indican la necesidad de la utilización de nuevas estrategias para aumentar la duración de la respuesta inmune. Más recientemente se ha demostrado que la combinación de vacunas de ADN con otras vacunas puede generar respuestas inmunes más eficientes que los mismos abordajes aisladamente.

El pedido de patente WO2008/127307, publicado el 23/10/2008, está dirigido a un método de inducción de respuesta inmune contra el virus de la dengue usando una metodología de vacunación de dosis / refuerzo. Más específicamente, el documento WO2008/127307 está dirigido a la administración de una dosis de un inmunógeno del virus de la dengue que comprende una vacuna de ADN o una vacuna tetravalente de ADN o una vacuna tetravalente inactivada purificada y una dosis refuerzo de un inmunógeno del virus de la dengue, abarcando una vacuna viral tetravalente de virus atenuado. Sin embargo, esta estrategia presenta las dificultades inherentes a la utilización de una vacuna tetravalente de virus dengue atenuado, como, por ejemplo, la posibilidad de interferencia de uno o más virus en la replicación *in vivo* de los otros virus, llevando consecuentemente a respuestas inmunes heterogéneas con relación a los distintos serotipos virales. Además, el documento también está dirigido a la utilización de adenovirus conteniendo genes que codifican proteínas de dengue como esfuerzo para una vacuna tetravalente, lo que puede implicar en una baja eficiencia en la inducción de respuestas inmunes contra dengue en seres humanos. Tal hecho

se debe a la presencia, en seres humanos, de respuestas inmunes previas contra adenovirus, que pueden impedir la infección con adenovirus vector carreando genes del virus de la dengue, y, consecuentemente, comprometiendo la eficiencia de la respuesta inmune al virus de la dengue.

También se conoce el pedido de patente US20080193477, publicado el 14/08/2008, un método que emplea un régimen de inmunización abarcando la administración de una primera vacuna de fiebre amarilla seguida de la administración de una vacuna de dengue a base de flavivirus quimérico. Sin embargo, otros relatos en la literatura demostraron que la inmunización con el virus vacunal de la fiebre amarilla puede comprometer la eficiencia de la respuesta inmune generada posteriormente con virus quiméricos de fiebre amarilla conteniendo genes del virus de la dengue. En este caso, los niveles de anticuerpos neutralizantes contra el virus de la dengue fueron significativamente más bajos en monos previamente vacunados contra fiebre amarilla (Galler et al., 2005). Como se discutió aquí, verificamos que a pesar de los esfuerzos que se han realizado, todavía hay una necesidad para el desarrollo de vacunas de ADN más eficaces y capaces de inducir un aumento de la respuesta inmune, así como la utilización de estrategias vacunales combinadas que incrementen esta respuesta inmune.

Sumario de la Invención

El objetivo de la presente invención es propiciar un método para inducir una respuesta inmune contra virus de la dengue basado en vacunas de ADN y virus quiméricos 17D en inmunizaciones combinadas o coadministradas.

También es un objetivo de la invención suministrar una composición de vacunas de ADN contra los cuatro serotipos del virus dengue a partir de la construcción de distintos plásmidos recombinantes conteniendo los genes que codificaron

las proteínas E a partir de cada serotipo viral del virus dengue (DENV1-4), o solamente las secuencias que corresponden al dominio III de estas proteínas, todas fusionadas a la secuencia que codifica el péptido señal del t-PA.

Una composición vacunal consistiendo de (a) vacunas de ADN contra los cuatro serotipos del virus dengue a partir de la construcción de distintos plásmidos recombinantes conteniendo los genes que codifican las proteínas E a partir de cada serotipo viral del virus dengue, o solamente las secuencias que correspondan al dominio III de estas proteínas, todas fusionadas a la secuencia que codifica el péptido señal del t-PA; y (b) virus quiméricos comprendiendo el virus vacunal de fiebre amarilla 17D modificado, cuyas secuencias que codifican las proteínas prM y E de fiebre amarilla se sustituyeron por las secuencias que codifican las proteínas prM y E de los virus dengue de los distintos serotipos, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, está incluida en el objetivo de la presente invención.

La invención presenta aun un conjunto comprendiendo (a) vacunas de ADN contra los cuatro serotipos del virus dengue a partir de la construcción de distintas plásmidos recombinantes conteniendo los genes de las proteínas E, o solamente las secuencias que corresponden al dominio III de estas proteínas a partir de cada serotipo viral del virus dengue; y (b) virus quiméricos comprendiendo el virus vacunal de fiebre amarilla 17D modificado, cuyas secuencias que codifican las proteínas prM y E de fiebre amarilla se sustituyeron por las secuencias que codifican las proteínas prM y E de los virus dengue de los distintos serotipos.

Breve Descripción de las Figuras

La Figura 1 es una representación esquemática de los plásmidos pcTPA, PE1D2 y pE2D2.

La Figura 2 muestra la inmunofluorescencia de células

BHK-21 transfectadas con los plásmidos pE1D2 (A y A'), pE2D2 (B y B´) y pcTPA (C y C´), donde el contraste de fase se muestra en A, B y C; la fluorescencia se muestra en A', B' y C' (aumento de 1000x A y B, 400x C).

Las Figuras 3A-3B muestran los resultados del primer experimento con pE1D2.

Las Figuras 3C-3D muestran los resultados del segundo experimento con pE1D2.

Las Figuras 4A-4B muestran los resultados del primer experimento con pE2D2.

Las Figuras 4C-4D muestran los resultados del segundo experimento con pE2D2.

Las Figuras 5A-5D muestran los resultados del tercer experimento con combinaciones simultaneas con pE1D2, pE2D2, 17D-D2.

Descripción Detallada de la Invención

Los presentes inventores encontraron en el estado del arte que la proteína del sobre (E) del virus de la dengue es un fuerte inmunógeno, pudiendo generar una respuesta protectora con altos niveles de anticuerpos neutralizantes. Siendo así, el primer objetivo de la presente invención es construir vacunas de ADN contra dengue conteniendo los genes que codifican las proteínas E, sin la región hidrofóbica C-terminal, o conteniendo las secuencias de los dominios III de estas proteínas, insertados en el plásmido pcTPA, que posee la secuencia señal del activador de plasminogeno de tejido humano (t-PA), un eficiente péptido señal ya probado en otras vacunas. La presente invención también tiene como objetivo establecer un método para inducir una respuesta inmune protectora contra los virus de la dengue, basada en la administración de vacunas de ADN y virus quiméricos 17D en inmunizaciones combinadas en el sistema de dosis / refuerzo o coadministración de las dos vacunas.

El plásmido pcTPA contiene una secuencia de ADN correspondiente al péptido señal del gen del activador de plasminogeno de tejido humano (t-PA). Existen diferencias en el tamaño de la región del t-PA identificada como péptido señal. El artículo que describe el clonaje y el secuenciamiento del gen del t-PA (Pennica et al., Nature, 301:214-221, 1983) identifica una región de 105 pares de bases, que codifica los primeros 35 aminoácidos, como péptido señal. El plásmido pcTPA contiene una secuencia de 69 pares de bases que corresponde a los primeros 23 aminoácidos SEQ ID NO:8. La secuencia correspondiente al péptido señal del t-PA se clonó en el plásmido pcDNA3 (Invitrogen) utilizando los sitios de las enzimas de restricción *Hind*III y *Eco*RV. De esta forma, cualquier secuencia se puede clonar aguas abajo al sitio *Eco*RV, utilizando el sitio de esta enzima que genera fragmentos de punta ciega, pudiendo, por lo tanto, ligar-se a otro fragmento también de punta ciega, sin que necesariamente se haya digerido con *Eco*RV. Además de este sitio, el plásmido pcTPA conserva los cinco sitios de enzimas de restricción aguas debajo al de la *Eco*RV (*Bst*XI, *Not*I, *Xho*I, *Xba*I y *Apa*I), oriundos del sitio múltiple de clonaje del plásmido pcDNA3, que también se pueden utilizar para clonajes de nuevas secuencias.

Para la construcción de los distintos plásmidos recombinantes, conteniendo la secuencia que codifica la proteína E sin su porción hidrofóbica C-terminal (E80%) - SEQ ID NO:6 -, o solamente la secuencia que corresponde al dominio III - SEQ ID NO:7 - de esta proteína, se utilizó el linaje de DENV2 Nova Guiné C (NGC) (M29095; gi:323447). Ese virus se obtuvo a partir de la cultura de células Vero infectadas. Los fragmentos del gen E clonados en el plásmido pcTPA se amplificaron por PCR a partir del RNA total de células vero infectadas con DENV2 NGC. El RNA sirvió como

molde para la síntesis de un cADN conteniendo las regiones blanco, utilizando oligonucleótidos específicos. Este cADN sirvió entonces como molde para la amplificación por PCR de las secuencias blanco, utilizando otros oligonucleótidos conteniendo sitios de enzimas de restricciones que se usaron en los clonajes. Los fragmentos amplificados se solucionaron en gel de agarosas y, enseguida, se retiraron y purificaron con resinas (gen clean). Los fragmentos obtenidos, así como el plásmido pcTPA, se digirieron con enzimas de restricciones específicas y se ligaron con T4 ADN ligasa. Los clones recombinantes se obtuvieron en *Escherichia coli*, cepa DH5-α, transformada con estos plásmidos, confirmados por digestiones con enzimas de restricción y posteriormente por secuenciamiento.

Para evitar la capacidad de los plásmidos recombinantes, obtenidos de acuerdo a lo descripto anteriormente, de mediar la expresión de las proteínas E, sin la región hidrofóbica en la porción C-terminal (E80%) o solamente su dominio III (dom III), se realizaron ensayos de análisis de la expresión *in vitro* de estas proteínas utilizando células BHK-21 transfectadas con los distintos plásmidos. Los plásmidos recombinantes se obtuvieron a partir del plásmido pcTPA, que se construyó a partir del plásmido pcaDNA3 (Invitrogen). Ese vector promueve la expresión de las proteínas recombinantes bajo el control del promotor del citomegalovirus humano (CMV) y contiene la secuencia que codifica el péptido señal del activador de plasminogeno de tejido humano (t-PA), que dirige estas proteínas para el medio extracelular.

Para evaluar la producción de las proteínas de interés, culturas de células BHK-21 se transfectaron con los plásmidos recombinantes, utilizando lipofectamina, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La expresión de las proteínas recombinantes se analizó por inmunofluorescencia, de acuerdo

a lo descripto en Costa SM et al., 2006. Para la producción en gran escala de los plásmidos recombinantes y control se utilizaron bacterias *E. coli*, cepa DH5-α, transformadas con los distintos plásmidos y cultivadas en medio TB líquido, durante la noche, a 37°C. Los plásmidos se purificaron en columnas de cambio iónico, utilizando el conjunto QIAGEN tip 10.000 de acuerdo a la recomendación del fabricante, y suspendidos en agua, cuantificados en espectrofotómetro y gel de agarosas. Las vacunas de ADN se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

Las vacunas de ADN de la presente invención se probaron aisladamente en lo que se refiere a su capacidad protectora. Esas pruebas tuvieron por finalidad analizar la eficiencia de la expresión de las proteínas recombinantes *in vitro*, evaluar la respuesta de anticuerpos generada en ratones y realizar ensayos de desafíos con inoculaciones intracerebrales de dosis letales del virus. Los tests de soroneutralización también se realizaron con células Vero y con los virus citados anteriormente, de acuerdo a lo descripto por Cafour et al., 2001.

Para la evaluación de las construcciones obtenidas grupos de ratones BALB/c machos con alrededor de cuatro semanas de edad se inmunizaron con los plásmidos recombinantes y control. Los ratones se inocularon por vía intramuscular (im) en los cuádriceps posteriores con estos plásmidos diluidos en PBS. En cada inoculación se inyectaron 100 µg de ADN por animal (50 µg por pata). En el nuevo abordaje de inmunización de esta invención, es decir, el sistema de dosis (vacuna de ADN) y refuerzo (virus quimérico) o inmunizaciones simultáneas (coadministración), las vacunas de ADN de esta invención se probaron en inmunizaciones combinadas con virus quimérico (17D-D2). Esta quimera se construyó a partir del virus vacunal de la fiebre amarilla YF

17D, con la sustitución de los genes que codifican las proteínas prM y E de este virus por los genes prM y E de DENV2, cepa NGC, SEQ ID NO:9. Vale resaltar que los tests de ese nuevo abordaje de inmunización se iniciaron con la construcción de las vacunas de DNA de DENV2 y la realización de un test de desafío que demostró la capacidad protectora de estas vacunas, principalmente cuando se utilizó la secuencia que codifica el gen E sin su porción hidrofóbica C-terminal.

Para la construcción de la quimera 17D-D2 se utilizó el abordaje del cADN infeccioso de fiebre amarilla, desarrollado por Rice et al, 1989, que consiste en dos plásmidos: pYF5'3'IV y pYFM5.2. En este abordaje el genoma del virus de fiebre amarilla se separó en los dos plásmidos citados anteriormente, dada la falta de estabilidad de algunas secuencias virales en plásmidos de alto número de copias. Estos plásmidos se digirieron con enzimas de restricciones específicas y los fragmentos generados se ligaron, reconstituyendo el genoma completo del virus vacunal de fiebre amarilla. Sin embargo, tests en monos con este virus indicaron la necesidad de modificaciones genéticas del cADN para hacer con que virus sea más atenuado (Marchevsky et al., 1995). Tales modificaciones las realizaron Galler y Freire (US 6.171.854) y resultaron en nuevas versiones de los plásmidos pYF5'3'IV y pYFM5.2, denominados G1/2 y T3/27, respectivamente. Posteriormente, se utilizó el plásmido pACNR1180 (Ruggli et al., 1996) que posee un origen de replicación (P15A), que limita el número de replicaciones de este plásmido, reduciendo así el número de copias del ADN plasmidial en bacterias. El plásmido pACNR1180 se describió como un plásmido ideal para clonaje del genoma del virus de fiebre porcina, cuyo tamaño se asemeja al del genoma del virus de la fiebre amarilla, permitiendo la estabilidad del genoma clonado. Teniendo en vista estos resultados, el genoma

entero del virus de fiebre amarilla se clonó en un plásmido modificado del pACNR1180 (con la retirada de algunos sitios de enzimas de restricción), generando el plásmido pYF17D/14. El plásmido pYF17D/14 se generó en dos etapas. Primero el plásmido G1/2 se utilizó como molde para la amplificación por PCR de distintos fragmentos que se insertaron en el plásmido modificado del pACNR1180, generando el plásmido NSK7. Posteriormente, el plásmido NSK7 se utilizó para el clonaje del resto del genoma del virus vacunal 17D contenido en el plásmido T3/27, generando entonces el plásmido pYF17D/14. Todos los plásmidos se propagaron en *E. coli* MC1061 y purificaron en columna Qiagem. Para la construcción de la quimera 17D-D2 se utilizó el virus DENV2 cepa Nova Guiné. Se sintetizó un cADN, de forma semejante a la descripta anteriormente para los clonajes en las vacunas de DNA, que contenía la región del genoma del virus de la dengue que va desde el primer nucleótido correspondiente al gene que codifica la proteína prM hasta la secuencia correspondiente al aminoácido 205 de la proteína E. Esta región se amplificó por PCR y insertó en el plásmido G1/2 entre los sitios para las enzimas de restricción *Apa*I y *Not*I, generando el plásmido pG1/2 DEN2. El cADN conteniendo el genoma completo 17D-D2 se construyó a partir de la ligación de los fragmentos *Not*I/*Nsi*I generado con la digestión del plásmido pG1/2 DEN2 (con el promotor SP6, la región 5′ NTR-C de fiebre amarilla y prM-2/3E de DENV2), *Nsi*I/*Mlu*I generado con la digestión del plásmido pYFD/F11/12 (codificando la región 3′ de E de DENV1 y el inicio del gen NS1 de fiebre amarilla), y *Mlu*I/*Not*I generado con la digestión del plásmido pYF17D/14 (que contiene el resto del genoma de fiebre amarilla). Todos los plásmidos se propagaron en *E. Coli* XL-1 Blue y purificaron con Concert High Purity System (Invitrogen). El plásmido completo se linearizó con XhoI y utilizó para la

transcripción *in vitro*, por medio de la región promotora SP6. El ARN sintetizado *in vitro* se utilizó para la regeneración viral por electroporación de células Vero de forma similar a la descripta en el documento US 6.171.854.

Además de las inoculaciones con las vacunas de ADN asiladas, se analizó también la respuesta inmune generada en ratones tratados con inmunizaciones combinadas: sistema de dosis (vacuna de ADN) y refuerzo (virus quimérico 17D-D2), e inmunizaciones simultaneas (coadministración) de los dos tipos de vacunas. En el sistema de dosis / refuerzo, ratones BALB/c recibieron dos dosis de las vacunas de ADN de DENV2, como descripto anteriormente, y dos semanas después de la última dosis se inocularon por vía subcutánea (sc) o intramuscular (im) con 4 log10 PFU de virus quimérico (17D-D2). En las inmunizaciones simultaneas (coadministración), las dos vacunas (ADN y quimera 17D-D2) se mezclaron en solución salina tamponada (PBS) e inocularon por vía im, en dos dosis con intervalo de dos semanas.

La respuesta inmune generada con las vacunas del ADN aisladamente o en conjunto con virus quimérico se evaluó por la producción de anticuerpos neutralizantes.

Los animales se sangraron por vía retro-orbital dos semanas después de la segunda dosis de ADN o dos semanas después de la última inmunización, y al final de los tests de desafío con DENV2. El suero pre inmune se obtuvo el día anterior al comienzo de las inmunizaciones. En los ensayos de neutralización, los virus DENV se incubaron con distintas diluciones de los sueros de los ratones inmunizados y posteriormente se evaluó la capacidad de estos virus de infectar células Vero, por medio de la formación de las placas de lisis. A partir de esos análisis es posible titular los niveles de anticuerpos neutralizantes.

Los ratones BALB/c inmunizados con los distintos

plásmidos aisladamente o en combinación con el virus 17D-D2 fueron desafiados por inoculación intracerebral de DENV2 (aproximadamente 4.3 log10 PFU, que corresponde a una LD50 de 3,8), 25 días después de la última dosis de ADN o 10 días después de la inoculación con el virus quimérico. Antes del desafío, los animales se anestesiaron con una mezcla de ketamine-xylazine. La titulación del virus se hizo en células Vero así que su hizo la inoculación en los animales, como descripto por Caufour et al., 2001. Los ratones se evaluaron diariamente hasta 21 días tras el desafío en lo que se refiere a la morbilidad, principalmente el desarrollo de parálisis en los miembros posteriores, y mortalidad. Los animales moribundos se sacrificaron, así como los que sobrevivieron 21 días tras el desafío. La sangre de estos ratones se cosechó para los tests de seroneutralización.

La invención ahora se describirá por medio de ejemplos. Los ejemplos siguientes son ilustrativos de la invención y representan las modalidades preferidas. Los que están habilitados en el estado del arte saben o son capaces de encontrar, usando nada más que experimentación de rutina, cómo emplear otros materiales y técnicas apropiadas.

Ejemplo 1 - Construcción del vector de expresión pcTPA:

Un nuevo plásmido de expresión se construyó insertando la secuencia que codifica el péptido señal del activador de plasminogeno de tejido humano (t-PA) - SEQ ID NO:8 en el plásmido original pcDNA3 (Invitrogen). El fragmento equivalente a esta secuencia se amplificó por PCR, utilizando iniciadores específicos (Figura 1).

A continuación presentamos los oligonucleótidos usados para la reacción de amplificación por PCR. Los sitios de restricción *Hind* III y *Eco*RV están sublineados, respetivamente.

SEQ ID NO:1 - Oligonucleotídeo senso (TPA1)

5'GGGGAAGCTTATGGATGCAATGAAGAGG3'

SEQ ID NO:2 - Oligonucleótido antisenso(TPA2)

5'GGGGATATCGCTGGGCGAAACGAAGAC3'

El producto de PCR, conteniendo 69 pb, se digirió y clonó en el plásmido pcDNA3 entre los sitios de las enzimas *Hind*III y *Eco*RV. La secuencia se confirmó por secuenciamiento y el plásmido recombinante se denominó pcTPA (Figura 1A).

Ejemplo 2 - Construcción de pE1D2 y pE2D2

Se construyeron dos plásmidos (pE1D2 y pE2D2) a partir del plásmido pcTPA. El plásmido pcTPA deriva del plásmido pcDNA3 (Invitrogen) con la adición de la secuencia que codifica el péptido señal del activador del plasminogeno de tejido humano (t-PA), entre los sitios de las enzimas de restricción (*Hind*III y *Eco*RV, aguas debajo de la región promotora derivada del citomegalovirus humano, contenido en el plásmido pcDNA3).

El plásmido pE1D2 se construyó con la inserción de la secuencia que codifica el 80% de la proteína del sobre viral (E) del virus de dengue, serotipo 2 (DENV2), sin la porción C-terminal de la proteína E. Esta secuencia, contenida entre los nucleótidos 937 y 2131 del genoma completo del DENV2, cepa Nova Guiné C (NGC) (Genebank: M29095) se amplificó por PCR, utilizando los oligonucleótidos senso y antisenso, identificados a continuación como SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:4, con los sitios para las enzimas de restricción *Eco*RV y *Xba*I subrayados, respectivamente:

SEQ ID NO:3 - 5´GGGGGATATCATGCGTTGCATAGGAATATC3´

SEQ ID NO:4 - 5´GGGGTCTAGATTACGATAGAACTTCCTTTC3´

Enseguida se hizo el clonaje de la secuencia en el plásmido pcTPA entre los sitios de las enzimas de restricción *Eco*RV y *Xba*I, en el mismo cuadro abierto de lectura de la secuencia que codifica el péptido señal t-PA, generando el plásmido pE1D2 de acuerdo a la figura 1B.

El plásmido pE2D2 se construyó con la inserción de la secuencia que codifica el dominio III de la proteína E de DENV2, contenida entre los nucleótidos 1822 y 2131 del genoma completo de DENV2, cepa NGC (Genebank: M29095). Esta secuencia se amplificó por PCR, utilizando los oligonucleótidos senso y antisenso, identificados a continuación como SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6, con los sitios para las enzimas de restricción *Eco*RV y *Xba*I subrayados, respectivamente:

SEQ ID NO:5 - 5´GGGGGATATCGGAATGTCATACTCTATG3´

SEQ ID NO:4 - 5´GGGGTCTAGATTACGATAGAACTTCCTTTC3´

Enseguida se hizo el clonaje de la secuencia en el plásmido pcTPA entre los sitios de las enzimas de restricción *Eco*RV y *Xba*1, en el mismo cuadro abierto de lectura de la secuencia que codifica el péptido señal t-PA, generando el plásmido pE2D2 de acuerdo a la figura 1C.

Todos los clonajes se confirmaron por secuenciamiento. La bacteria *Escherichia coli*, cepa DH5-α, se utilizó para los clonajes y producción de los plásmidos en pequeña y gran escala.

Los plásmidos se aislaron por el método de extracción alcalina, purificaron en columna de intercambio iónico (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, resuspendidos en agua miliQ estéril y almacenados a -20°C hasta su utilización.

Ejemplo 3 - Virus quimérico 17D-D2

El virus quimérico 17D-D2 se construyó cambiando los genes que codifican las proteínas de membrana (prM) y del sobre (E) del virus vacunal de la fiebre amarilla YF 17DD, por los genes que codificaron las proteínas prM y E de DENV2, cepa NGC. Detalles de la construcción del virus quimérico 17D-D2 se pueden encontrar en Cafour et al., 2001.

Para la construcción de la quimera 17D-D2 se utilizó el

abordaje del cADN infeccioso de fiebre amarilla, desarrollado por Rice et al., 1989, que consiste en dos plásmidos: pYF5'3'IV y pYFM5.2. En este abordaje del genoma del virus de fiebre amarilla se separó en los dos plásmidos citados anteriormente, dado la falta de estabilidad de algunas secuencias virales en plásmidos de alto número de copias. Estos plásmidos se digirieron con enzimas de restricciones específicas y los fragmentos generados se ligaron, reconstituyendo el genoma completo del virus vacunal de fiebre amarilla. Sin embargo, tests en monos con este virus indicaron la necesidad de modificaciones genéticas del cADN para hacer con que el virus sea más atenuado (Marchevsky et al, 1995). Tales modificaciones las realizó Galler e Freire (US 6.171.854) y resultaron en nuevas versiones de los plásmidos pYF5'3'IV y pYFM5.2, denominados G1/2 y T3/27, respectivamente. Posteriormente, se utilizó el plásmido pACNR1180 (Ruggli et al., 1996), que posee un origen de replicación (P15A) que limita el número de replicaciones de este plásmido, reduciendo así el número de copias del ADN plasmidial en bacterias. El plásmido pACNR1180 se describió como un plásmido ideal para clonaje del genoma del virus de fiebre porcina, cuyo tamaño se asemeja al del genoma del virus de la fiebre amarilla, permitiendo la estabilidad del genoma clonado. Teniendo en vista estos resultados, el genoma entero del virus de fiebre amarilla se clonó en un plásmido modificado del pANCR1180 (con la retirada de algunos sodios de enzimas de restricción), generando el plásmido pYF17D/14. El plásmido pYF17D/14 se generó en dos etapas. Primero el plásmido G1/2 se utilizó como molde para la amplificación por PCR de distintos fragmentos que se insertaron en el plásmido modificado del pACNR1180, generando el plásmido NSK7. Posteriormente, el plásmido NSK7 se utilizó para el clonaje del resto del genoma del virus vacunal 17D contenido en el

plásmido T3/27, generando, entonces, el plásmido pYF17D/14. Todos los plásmidos se propagaron en *E. coli* MC1061 y purificaron en columna Qiagen. Para la construcción de la quimera 17D-D2 se utilizó el virus DENV2 cepa Nova Guiné. Se sintetizó un cADN, de forma semejante a la descripta anteriormente para los clonajes en las vacunas de ADN, que contenía la región del genoma del virus de la dengue que va desde el primer nucleótido correspondiente al gen que codifica la proteína prM hasta la secuencia correspondiente al aminoácido 205 de la proteína E. Esta región se simplificó por PCR y insertó en el plásmido G1/2 entre los sitios para las enzimas de restricción *Apa*I y *Not*I, generando el plásmido pG1/2 DEN2. El cADN conteniendo el genoma completo 17D-D2 se construyó a partir de la unión de los fragmentos *Not*I/*Nsi*I generado con digestión del plásmido pG1/2 DEN2 (con el promotor SP6, la región 5' NTR-C de fiebre amarilla y prM-2/3E de DENV2), *Nsi*I/*Mlu*I generado con la digestión del plásmido pYFD/F11/12 (codificando la región 3' de E de DENV1 y el inicio del gen NS1 de fiebre amarilla), y *Mlu*I/*Not*I generado con la digestión del plásmido pYF17D/14 (que contiene el resto del genoma de fiebre amarilla). Todos los plásmidos se propagaron en *E. coli* XL-1 Blue y purificaron con Concert High Purity System (Invitrogen). El plásmido completo se linearizó con *Xho*I y utilizó para la transcripción *in vitro*, por medio de la región promotora SP6. El ARN sintetizado *in vitro* se utilizó para la regeneración viral por electroporación de células Vero de forma similar a la descripta en el documento US 6.171.854.

Ejemplo 4 - Evaluación de la expresión de las proteínas recombinantes

La expresión de las proteínas recombinantes se evaluó *in vitro* en células de riñón de hámsteres neonatos (BHK-21) infectadas con los distintos plásmidos, utilizando

lipofectamina (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La expresión de las proteínas E1 y E2 se detectó por inmunofluorescencia en las células BHK transfectadas y observadas en microscopio óptico de fluorescencia utilizando fluido ascítico anti-DENV2 (ATCC) y anticuerpos anti-IgG de ratón conjugados a fluoresceína (Southern Biotechnology). Solamente las células transfectadas con los plásmidos pE1D2 y pE2D2 se mostraron fluorescentes, demostrando que estas construcciones son capaces de mediar la expresión de las proteínas del virus de la dengue en células de mamíferos, de acuerdo a la Figura 2.

Ejemplo 5 - Inmunizaciones

Se realizaron dos experimentos independientes para probar el potencial protector de las vacunas de ADN aisladamente o en conjunto con el virus quimérico 17D-D2 en el sistema de dosis / refuerzo, utilizando ratones BALB/c con aproximadamente 4 semanas de edad.

Para las inmunizaciones con las vacunas de ADN, los plásmidos se diluyeron en PBS (concentración final 1x) y los animales se inocularon por vía intramuscular (im) en los cuádriceps posteriores con 100 µg/100 µL de la vacuna de ADN por animal (50 µg/50 µL por pata). Para las inmunizaciones con el virus quimérico 17D-D2, los animales se inocularon por vía subcutánea (sc) en el coxim plantar o intramuscular (im) en los cuádriceps posteriores, con 4 log 10 PFU de virus diluido en medio M199 (Sigma) o en PBS. El plásmido pcTPA se utilizó como control negativo.

Se realizó un tercer experimento con inmunizaciones simultaneas (coadministración) de vacunas de ADN y 17D-D2 por vía im. En este caso, las dos vacunas se mezclaron en una sola solución con PBS.

Los animales se separaron en grupos (10 ratones por grupo). Enseguida, los animales se inmunizaron a cada dos

semanas y dos semanas después de la última inmunización los animales se desafiaron con inoculación por vía intracerebral (ic) de una dosis letal de DENV2 NGC (3,8 LD_{50}), neuroadaptado a ratones. Enseguida, los animales se evaluaron diariamente hasta el 21° día en los que se refiere a la morbilidad (desarrollo de parálisis, principalmente en los miembros posteriores) y supervivencia.

Los cronogramas de las inmunizaciones están representados en la Figura 3. Los Cuadros 1, 2 y 3 que se presentan a continuación muestran los esquemas de inmunización.

El Cuadro 1 muestra el esquema de inmunización del primer experimento con protocolo de dosis y refuerzo (prime/boost) o inmunizaciones individuales.

TABLA 1

Grupos	**Inmunización**
1	pE1D2 (2 dosis im)
2	pE1D2 (2 dosis im) + 17D-D2 (1 dosis sc)
3	pE2D2 (2 dosis im)
4	PE2D2 (2 dosis im) + 17D-D2 (1 dosis sc)
5	PcTPA (2 dosis im)
6	pcTPA (2 dosis im) + 17D-D2 (1 dosis sc)
7	17D-D2 (1 dosis sc)
8	17D-D2 (2 dosis sc)
9	No inmunizado y solamente desafiado con DENV2

El Cuadro 2 muestra el esquema de inmunización del segundo experimento con protocolo de dosis y refuerzo (prime/boost) o inmunizaciones individuales.

TABLA 2

Grupos	**Inmunización**
1	pE1D2 (2 dosis im)
2	pE1D2 (2 dosis im) + 17D-D2 (1 dosis sc)
3	pE2D2 (2 dosis im)
4	pE2D2 (2 dosis im) + 17D-D2 (1 dosis sc)
5	17D-D2 (2 dosis sc)
6	17D-D2 (2 dosis im)
7	No inmunizado y solamente desafiado con DENV2

El Cuadro 3 muestra el esquema de inmunización del tercer experimento con protocolo de inmunización simultanea (coadministración).

TABLA 3

Grupos	**Inmunización**
1	pE1D2 + 17D-D2 - 2 dosis im
2	pE2D2 + 17D-D2 - 2 dosis im
3	pcTPA + 17D-D2 - 2 dosis im

Resultados de Protección - Primer Experimento

En el primer experimento, las señales clínicas de la enfermedad se detectaron entre el séptimo y el octavo día tras el desafío con DENV2 en los grupos de los animales no inmunizados o aquellos que recibieron el plásmido control (pcTPA). Trece días después del desafío, el 100% de estos ratones presentaron parálisis o muerte. Por otro lado, el

100% de los animales vacunados con solamente 2 dosis de pE1D2, 2 dosis de pE1D2 + 1 dosis de 17D-D2, o 2 dosis de 17D-D2, sobrevivieron al desafío.

En lo que se refiere al surgimiento de señales clínicas, solamente el grupo de ratones inmunizados con 2 dosis de pE1D2 + 1 dosis de 17D-D2 no presentó ninguna señal.

El grupo de animales que recibió solamente el plásmido pE1D2 o el virus 17D-D2 presentó el 10% y el 20% de parálisis, respectivamente, de acuerdo a lo mostrado en las Figuras 3A y 3B.

La vacuna pE2D2 se mostró menos protectora cuando se comparó a la vacuna pE1D2. Solamente el 50% de los animales inmunizados con 2 dosis de pE2D2 sobrevivió al desafío y el 70% presentó morbilidad. Por otro lado, el 100% de los animales inmunizados con 2 dosis de pE2D2 + 1 dosis de 17D-D2 sobrevivió al desafío y solamente el 10% de estos ratones presentó cualquier señal clínica de la enfermedad, de acuerdo a lo mostrado en las Figuras 3A y 3B.

Resultados de Protección - Segundo Experimento

En el segundo experimento, las proporciones de sobrevivencia y morbilidad en los grupos de animales inmunizados con los plásmidos pE1D2 y pE2D2 aisladamente o en el sistema de dosis y refuerzo (vacuna de ADN + 17D-D2) fueron semejantes a los datos obtenidos en el primer experimento. Una vez más la inmunización en el sistema de dosis y refuerzo se mostró más eficiente, generando el 100% de protección, de acuerdo a las Figuras 3C, 3D, 4C y 4D.

Resultados de Protección - Tercer Experimento

Las inmunizaciones simultaneas pE1D2 + 17D-D2 y pE2D2 + 17D-D2 se mostraron tan eficientes como las inmunizaciones en el sistema dosis / refuerzo, induciendo una protección en el 100% de los animales, independientemente de la vía de

inoculación del virus 17D-D2 (im o sc), sin el surgimiento de ninguna señal clínica de la enfermedad.

Ninguna de las vacunas administradas aisladamente (vacuna de ADN o quimera 17D-D2) indujo protección sin el desarrollo de parálisis en ninguno de los animales probados (Figuras 5).

Resultados de Seroneutralización

Para la detección de los niveles de anticuerpos neutralizantes generados con las vacunas probadas, los sueros de los animales se cosecharon dos semanas después de la inmunización con las vacunas de ADN y/o virus quimérico (antes del desafío con DENV) y 21 días tras el desafío con DENV2. En los ensayos de seroneutralización, los virus DENV2 se incubaron con distintas diluciones de los sueros de los ratones inmunizados y posteriormente se evaluó la capacidad de estos virus de infectar células Vero, por medio de la formación de las placas de lisis. El título de anticuerpos neutralizantes se calculó a partir de la reducción del 50% de las placas de lisis ($PRNT_{50}$).

Los resultados están ejemplificados en la tabla 4, con los sueros de los animales utilizados en el primer experimento de inmunización en el sistema de dosis y refuerzo. Los resultados demostraron un aumento significativo de los niveles de anticuerpos neutralizantes en los animales que recibieron la inmunización combinada en el sistema de dosis / refuerzo.

	TABLA 4		
	Títulos de anticuerpos neutralizantes (PRNT50)		
Animales	2 dosis de la vacuna pE1D2	2 dosis pE1D2 + refuerzo 17D-D2	2 dosis pE1D2 + refuerzo 17D-D2 +

			desafío DENV2
1	1:73	>1:640	>1:640
2	1:60	>1:640	>1:640
3	1:8	1:240	>1:640
4	1:24	1:33	1:120
5	ND	1:160	>1:640
6	1:40	ND	>1:640
7	1:47	1:448	>1:640
8	ND	1:533	>1:640
9	1:86	>1:640	>1:640
10	1:25	1:320	>1:640

Control negativo - 2 dosis pcTPA	<1:5
Control Positivo - suero de mono inmune	>1:640

La presente invención se ejemplificó para DENV2. Sin embargo, la construcción de vacunas de ADN contra los demás serotipos del virus dengue (DENV 1,3 y 4) obedece la misma metodología aquí descripta para el DENV2.

La(s) composición(es) de la presente invención puede(n) contener un vehículo farmacéutico aceptable. Cualquier vehículo farmacéutico conocido de aquellos especialistas en el arte se puede usar en la(s) composición(es) de la presente invención, dependiendo de la forma de administración.

El término vehículo farmacéutico se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente, o un vehículo con el cual la vacuna de ADN o el virus quimérico se administra. Esos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceite, incluyendo aquellos de origen animal, vegetal o sintético. Excipientes farmacéuticos incluyen almidón, glucosa, fructosa, gelatina, malte, arroz, harina, silica gel, estearato de sodio, monoeatearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche en polvo descremada, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y semejantes. La(s)

composición(es) de esta invención, si se desea, puede(n) contener cantidades pequeñas de agentes emulsificantes, o agentes taponadores de pH.

La presencia de un vehículo farmacéutico dependerá de la administración de la composición vacunal. Por ejemplo, para la administración parenteral, tal como una inyección subcutánea, el vehículo preferido consiste en agua, solución salina, alcohol, grasa, ceras o solución tampón. Para administración oral se pueden emplear manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sucrosa y carbonato de magnesio.

También se pueden usar agentes conteniendo una substancia para proteger el antígeno de rápido catabolismo, tal como hidróxido de aluminio o aceite mineral.

La presente invención utilizó inoculación de las vacunas de ADN por vía im con dos dosis ADN, con 100 µg por dosis, administradas en un intervalo de dos semanas. También se pueden utilizar números distintos de dosis (como una, tres, cuatro etc.), con concentraciones distintas de ADN (variando de 0.1 µg a 1g), y administradas en intervalos de tiempo variados (de 1 semana a 1 año entre cada dosis de ADN).

Las inmunizaciones de las vacunas de ADN de la presente invención se realizaron por vía im, por medio de inyecciones con aguja. Otras vías de inmunización también se pueden utilizar, como, por ejemplo, por vía intradérmica, subcutánea, transcutanea, intravenosa o intraperitoneal. Tales inoculaciones se pueden administrar con o sin el auxilio de aguja. Como ejemplo de inoculación sin agujas podemos citar la utilización de inoculación por biobalística (*Genegun*), Bioeyector, adhesivos (*pads*) etc.

En el nuevo abordaje de inmunización de la presente invención, es decir, el sistema de dosis (vacuna de ADN) y refuerzo (virus quimérico 17D-D2) o inmunizaciones

simultaneas (coadministración), las vacunas de ADN se administraron por vía im por medio de jeringas con agujas y el virus quimérico 17D-2D se inoculó también con jeringas por vía im o sc. Para este abordaje también se podrán utilizar otras vías de inoculación, con o sin agujas, de acuerdo a lo ejemplificado anteriormente. Las inmunizaciones con vacunas de ADN y 17D-D2 se administraron en intervalos de dos semanas, tanto en el sistema de dosis y refuerzo como de coadministración. Tales inoculaciones también se pueden hacer con intervalos de tiempo variados (de 1 semana hasta 5 años), con distintas dosis (una, dos, tres etc.) Las concentraciones de las vacunas de ADN inoculadas (100 µg por dosis), así como de los virus quiméricos (4 log 10 PFU) también pueden variar de acuerdo a la adecuación del protocolo.

En el sistema de dosis y refuerzo de la presente invención, la primera inmunización (dosis) se realizó con vacunas de ADN, mientras que el refuerzo se hizo por la inmunización con virus quimérico. También es posible invertir este protocolo, con la primera inmunización con virus quiméricos y el refuerzo con vacunas de ADN, administradas en intervalos variados.

La presente invención utilizó el gen que codifica la proteína E del virus de la dengue. También se pueden utilizar otros genes de este virus, tales como las secuencias que codifican las proteínas C (capsideo), prM (membrana), NS1 (no estructural 1) y NS3 (no estructural 3). La proteína NS1 ya se probó en vacunas de ADN aisladas, demostrando potencial protector contra el virus de la dengue (Costa et al., 2006, 2007).

El nuevo abordaje de inmunización de la presente invención utiliza vacunas de ADN y virus quimérico vacunal de fiebre amarilla con genes del virus de la dengue (17D-D2). Este abordaje también se puede utilizar con vacunas de ADN y virus

quimérico vacunal 17D conteniendo genes de otros flavivirus. El abordaje también se puede usar con vacunas de ADN conteniendo genes de fiebre amarilla y virus vacunal 17D.

Así siendo, de acuerdo con la presente invención se suministra una vacuna efectiva contra el virus de la dengue. Adicionalmente, la invención también demostró un nuevo método para inducir una respuesta inmune contra el virus de la dengue basado en vacunas de ADN y virus quiméricos 17D en inmunizaciones combinadas, en el sistema de dosis (vacuna de ADN) y refuerzo (virus quimérico) o coadministración simultanea de las dos estrategias vacunales (vacunas de ADN y virus quiméricos en una misma formulación). Una composición vacunal y un conjunto comprendiendo vacunas de ADN contra los cuatro serotipos del virus dengue, virus quiméricos, también se presenta en la presente invención.

Referencias

[1] Barrett AD. Current status of flavivirus vaccines. Ann N Y Acad Sci. 2001, 951: 262-71

[2] Blair PJ, Kochel TJ, Raviprakash K, Guevara C, Salazar M, Wu SJ, Olson JG, Porter KR. Evaluation of immunity and protective efficacy of a dengue-3 pre-membrane and envelope DNA vaccine in Aotus nancymae monkeys. Vaccine. 2006, 24:1427-32.

[3] Caufour, P.S., Motta, M.C.A., Yamamura, A.M.Y., Vazquez, S., Ferreira, I.I., Jabor, A.V., Bonaldo, M.C., Freire, M.S. & Galler, R. Construction, characterization and immunogenicity of recombinant yellow fever 17D-dengue type 2 viruses. Virus Res., 2001 79:1-14).

[4] Chang GJ. Molecular biology of dengue viruses. In: Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever, Gubler,D.J.; Kuno,G.(eds), CAB International Publisher, 1997, pp. 175-198.

[5] Chen S, Yu M, Jiang T, Deng Y, Qin C, Qin E. Induction of tetravalent protective immunity against four dengue serotypes

by the tandem domain III of the envelope protein. DNA Cell Biol. 2007, 26:361-7.

[6] Costa SM, Paes MV, Barreto DF, Pinhao AT, Barth OM, Queiroz JL, Armoa GR, Freire MS & Alves AMB. Protection against dengue type 2 virus induced in mice immunized with a DNA plasmid encoding the non-structural 1 (NS1) gene fused to the tissue plasminogen activator signal sequence. Vaccine 2006, 24: 195-105.

[7] Costa S.M., Azevedo A.S., Paes M.V., Sarges F.S., Freire M.S. & Alves A.M. DNA vaccines against dengue virus based on the ns1 gene: the influence of different signal sequences on the protein expression and its correlation to the immune response elicited in mice. Virology 2007, 358:413-423.

[8] Encke J, zu Putlitz J, Geissler M, Wands JR. Genetic immunization generates cellular and humoral immune responses against the nonstructural proteins of the hepatitis C virus in a murine model. J. Immunol. 1998, 161: 4917-23.

[9] Galler R, Marchevsky RS, Caride E, Almeida LF, Yamamura AM, Jabor AV, Motta MC, Bonaldo MC, Coutinho ES, Freire MS. Attenuation and immunogenicity of recombinant yellow fever 17D-dengue type 2 virus for rhesus monkeys. Braz J Med Biol Res. 2005, 38:1835-46.

[10] Kinney RM & Huang CY-H Development of new vaccines against dengue fever and japanese encefalitis. Intervirology 2001, 44: 176-197.

[11] Kochel T., Wu S.-J., Raviprakash K., Hobart P., Hoffman S., Porter K. & Hayes, C. Inoculation of plasmids expressing the dengue-2 envelope gene elicit neutralizing antibodies in mice. Vaccine 1997, 15: 547-552.

[12] Lin YL, Chen LK, Liao CL, Yeh CT, Ma SH, Chen JL, Huang YL, Chen SS, Chiang HY. DNA immunization with Japanese encephalitis virus nonstructural protein NS1 elicits protective immunity in mice. J Virol. 1998, 72: 191-200.

[13] Marchevsky RS, Mariano J, Ferreira VS, Almeida E, Cerqueira MJ, Carvalho R, Pissurno JW, Travassos da Rosa APA, Simões MC, Santos CND, Ferreira II, Muylaert IR, Mann GF, Rice CM and Galler R. Phenotypic analysis of yellow fever virus derived from complementary DNA. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1995, 52:75-80.

[14] Phillpotts RJ, Venugopal K, Brooks T. Immunisation with DNA polynucleotides protects mice against lethal challenge with St. Louis encephalitis virus. Arch Virol. 1996, 141:743-749.

[15] Pennica D, Holmes WE, Kohr WJ, Harkins RN, Vehar GA, Ward CA, Bennett WF, Yelverton E, Seeburg PH, Heyneker HL, Goeddel DV, Collen D. Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in E. coli. Nature 1983,301:214-21.

[16] Putnak R, Fuller J, VanderZanden L, Innis BL, Vaughn DW. Am J Trop Med Hyg. Vaccination of rhesus macaques against dengue-2 virus with a plasmid DNA vaccine encoding the viral pre-membrane and envelope genes. 2003, 68:469-76.

[17] Raviprakash K., Porter K.R., Kochel T.J, Ewing D., Simmons M., Phillips I, Murphy G.S., Weiss W.R. & Hayes C.G. Dengue virus type 1 DNA vaccine induces protective immune responses in rhesus macaques. J. Gen. Virol. 2000, 81: 1569-1667.

[18] Rice CM, Grakoui A, Galler R, Chambers TJ. Transcription of infectious yellow fever RNA from full-length cDNA templates produced by in vitro ligation. New Biol. 1989, 1:285-96.

[19] Ruggli N; Tratschin J-D.; Mittelholzer C; Hofmann MA. Nucleotide sequence of classical swine fever virus strain Alfort/187 and Transcription of infectious RNA from stably cloned full-length cDNA. 1996, J. Virol. 70:3478-3487.

[20] Wu SF, Liao CL, Lin YL, Yeh CT, Chen LK, Huang YF, Chou

HY, Huang JL, Shaio MF & Sytwu HK. Evaluation of protective efficacy and immune mechanisms of using a non-structural protein NS1 in DNA vaccine against dengue 2 virus in mice. Vaccine 2003, 21, 3919-3929.

REIVINDICACIONES

1. Plásmido recombinante que codifica el ectodominio del sobre de proteína E, que consiste en los dominios I, II y III a partir de cada serotipo viral de virus dengue fusionadas a un péptido señal del activador de plasminogeno de tejido humano (t-PA).

2. Plásmido de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la secuencia identificada como SEQ ID NO:6 que codifica el ectodominio del sobre de proteína E, que consiste en los dominios I, II y III de dicha proteína del genoma completo DENV2, cepa Nueva Guinea C (NGC).

3. Plásmido recombinante que codifica el dominio III del sobre de proteína E a partir de cada serotipo del virus dengue, fusionadas a un péptido señal del activador de plasminogeno de tejido humano (t-PA).

4. Plásmido de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado por la secuencia identificada como SEQ ID NO:7, que codifica sólo el dominio III del sobre de proteína E del genoma completo DENV2, cepa Nueva Guinea C (NGC).

-/-

SEQUENCE LISTING

<110> Fundação Oswaldo Cruz
<120> METODO, KIT, PLASMIDOS Y COMPOSICIÓN PARA INDUCIR UNA RESPUESTA INMUNE AL VIRUS DEL DENGUE, SOBRE LA BASE DE ADN Y VACUNAS DE VIRUS QUIMÉRICAS

<130> P1844

<140> PCT/BR2010/000323
<141> 2010-08-01

<150> PI0904020-0
<151> 2009-10-01

<150> PI0904020
<151> 2009-10-01

<160> 9

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 28
<212> DNA
<213> Homo sapiens (iniciador senso t-PA)

<400> 1
ggggaagctt atggatgcaa tgaagagg 28

<210> 2
<211> 27
<212> DNA
<213> Homo sapiens (iniciador anti-senso t-PA)

<400> 2
ggggatatcg ctgggcgaaa cgaagac 27

<210> 3
<211> 30
<212> DNA
<213> Virus dengue serotipo 2 (iniciador senso E80%)

<400> 3
gggggatatc atgcgttgca taggaatatc 30

<210> 4
<211> 30
<212> DNA
<213> Virus dengue serotipo 2 (iniciador anti-senso E80%)

<400> 4
ggggtctaga ttacgataga acttcctttc 30

<210> 5
<211> 28
<212> DNA
<213> Virus dengue serotipo 2 (iniciador senso do doiminio III E)

<400> 5
gggggatatc ggaatgtcat actctatg 28

<210> 6
<211> 1203
<212> DNA
<213> Virus dengue serotipo 2 (E80%)

<400> 6
atgcgttgca taggaatatc aaatagagac tttgtagaag gggtttcagg aggaagctgg 60

gttgacatag tcttagaaca tggaagctgt gtgacgacga tggcaaaaaa caaaccaaca 120

ttggattttg aactgataga aacagaagcc aaacaacctg ccactctaag gaagtactgt 180

atagaggcaa agctgaccaa cacaacaaca gattctcgct gcccaacaca aggagaaccc 240

agcctaaatg aagagcagga caaaaggttc gtctgcaaac actccatggt ggacagagga 300

tggggaaatg gatgtggact atttggaaaa ggaggcattg tgacctgtgc tatgttcaca 360

tgcaaaaaga acatgaaagg aaaagtcgtg caaccagaaa acttggaata caccattgtg 420

ataacacctc actcagggga agagcatgca gtcggaaatg acacaggaaa acatggcaag 480

gaaatcaaaa taacaccaca gagttccatc acagaagcag agttgacagg ctatggcact 540

gtcacgatgg agtgctctcc gagaacgggc ctcgacttca atgagatggt gttgctgcaa 600

atggaaaata aagcttggct ggtgcacagg caatggttcc tagacctgcc gttgccatgg 660

ctgcccggag cggacacaca aggatcaaat tggatacaga aagagacatt ggtcactttc 720

aaaaatcccc atgcgaagaa acaggatgtt gttgttttgg gatcccaaga aggggccatg 780

cacacagcac tcacaggggc cacagaaatc cagatgtcat caggaaactt actgttcaca 840

ggacatctca agtgcaggct gaggatggac aaactacagc tcaaaggaat gtcatactct 900

atgtgcacag gaaagtttaa agttgtgaag gaaatagcag aaacacaaca tggaacaata 960

gttatcagag tacaatatga aggggacggt tctccatgta agatcccttt tgagataatg 1020

gatttggaaa aaagacatgt tttaggtcgc ctgattacag tcaacccaat cgtaacagaa 1080

aaagatagcc cagtcaacat agaagcagaa cctccattcg gagacagcta catcatcata 1140

ggagtagagc cgggacaatt gaagctcaac tggtttaaga aaggaagttc tatcgtaatc 1200

tag 1203

<210> 7
<211> 318
<212> DNA
<213> Virus dengue serotipo 2 (domIII E)

<400> 7
ggaatgtcat actctatgtg cacaggaaag tttaaagttg tgaaggaaat agcagaaaca 60

caacatggaa caatagttat cagagtacaa tatgaagggg acggttctcc atgtaagatc 120

ccttttgaga taatggattt ggaaaaaaga catgttttag gtcgcctgat tacagtcaac 180

ccaatcgtaa cagaaaaaga tagcccagtc aacatagaag cagaacctcc attcggagac 240

agctacatca tcataggagt agagccggga caattgaagc tcaactggtt taagaaagga 300

agttctatcg taatctag 318

<210> 8
<211> 69
<212> DNA
<213> Homo sapiens (peptído señal t-PA)

<400> 8
atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt 60

tcgcccagc 69

<210> 9
<211> 1983
<212> DNA
<213> Virus Dengue (prM/E)

<400> 9
ttccatttaa ccacacgtaa cggagaacca cacatgatcg tcagtagaca agagaaaggg 60

aaaagtcttc tgtttaaaac agaggatggt gtgaacatgt gtaccctcat ggccatggac 120

cttggtgaat tgtgtgaaga tacaatcacg tacaagtgtc cttttctcaa gcagaatgaa 180

ccagaagaca tagattgttg gtgcaactct acgtccacat gggtaactta tgggacgtgt 240

accaccacag gagaacacag aagagaaaaa agatcagtgg cactcgttcc acatgtggga 300

atgggactgg agacacgaac tgaaacatgg atgtcatcag aaggggcctg gaaacatgcc 360

cagagaattg aaacttggat cttgagacat ccaggcttta ccataatggc agcaatcctg 420

gcatacacca taggaacgac acatttccaa agagccctga ttttcatctt actgacagct 480

gtcgctcctt caatgacaat gcgttgcata ggaatatcaa atagagactt tgtagaaggg 540

gtttcaggag gaagctgggt tgacatagtc ttagaacatg gaagctgtgt gacgacgatg 600

gcaaaaaaca aaccaacatt ggattttgaa ctgatagaaa cagaagccaa acaacctgcc 660

actctaagga agtactgtat agaggcaaag ctgaccaaca caacaacaga ttctcgctgc 720

ccaacacaag gagaacccag cctaaatgaa gagcaggaca aaaggttcgt ctgcaaacac 780

tccatggtgg acagaggatg gggaaatgga tgtggactat ttggaaaagg aggcattgtg 840

acctgtgcta tgttcacatg caaaaagaac atgaaaggaa aagtcgtgca accagaaaac 900

ttggaataca ccattgtgat aacacctcac tcaggggaag agcatgcagt cggaaatgac 960

acaggaaaac atggcaagga aatcaaaata acaccacaga gttccatcac agaagcagag 1020

ttgacaggct atggcactgt cacgatggag tgctctccga gaacgggcct cgacttcaat 1080

gagatggtgt tgctgcaaat ggaaaataaa gcttggctgg tgcacaggca atggttccta 1140

gacctgccgt tgccatggct gcccggagcg gacacacaag gatcaaattg gatacagaaa 1200

gagacattgg tcactttcaa aaatccccat gcgaagaaac aggatgttgt tgttttggga 1260

tcccaagaag gggccatgca cacagcactc acaggggcca cagaaatcca gatgtcatca 1320

ggaaacttac tgttcacagg acatctcaag tgcaggctga ggatggacaa actacagctc 1380

aaaggaatgt catactctat gtgcacagga aagtttaaag ttgtgaagga aatagcagaa 1440

acacaacatg gaacaatagt tatcagagta caatatgaag gggacggttc tccatgtaag 1500

atccctttg agataatgga tttggaaaaa agacatgttt taggtcgcct gattacagtc 1560

aacccaatcg taacagaaaa agatagccca gtcaacatag aagcagaacc tccattcgga 1620

gacagctaca tcatcatagg agtagagccg ggacaattga agctcaactg gtttaagaaa 1680

ggaagttcta tcggccaaat gattgagaca acaatgaggg gagcgaagag aatggccatt 1740

ttaggtgaca cagcttggga ttttggatcc ctgggaggag tgtttacatc tataggaaag 1800

gctctccacc aagttttcgg agcaatctat ggggctgcct tcagtggggt ctcatggatt 1860

atgaaaatcc tcataggagt cattatcaca tggataggaa tgaattcacg cagcacctca 1920

ctgtctgtgt cactagtatt ggtgggagtc gtgacgctgt atttgggagt tatggtgcag 1980

gcc 1983

Fig. 1A

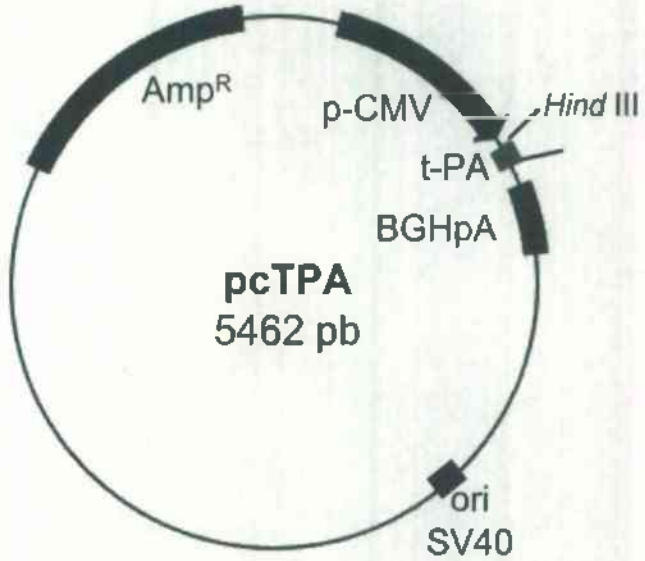


Fig. 1B

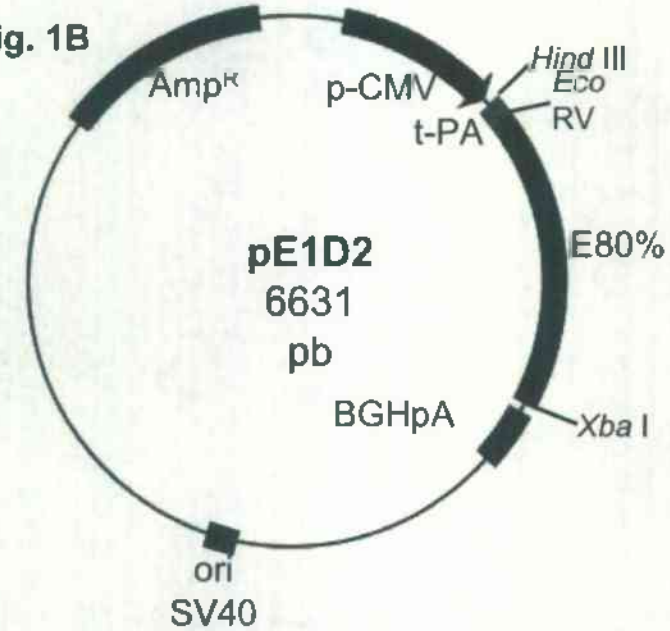


Fig. 1C

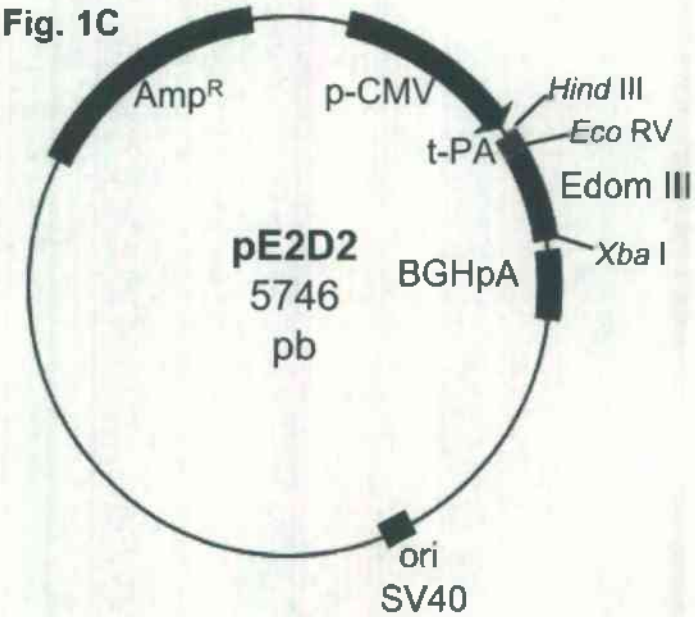


Fig. 2

pE1D2 – 1st Experiment

Fig. 3A

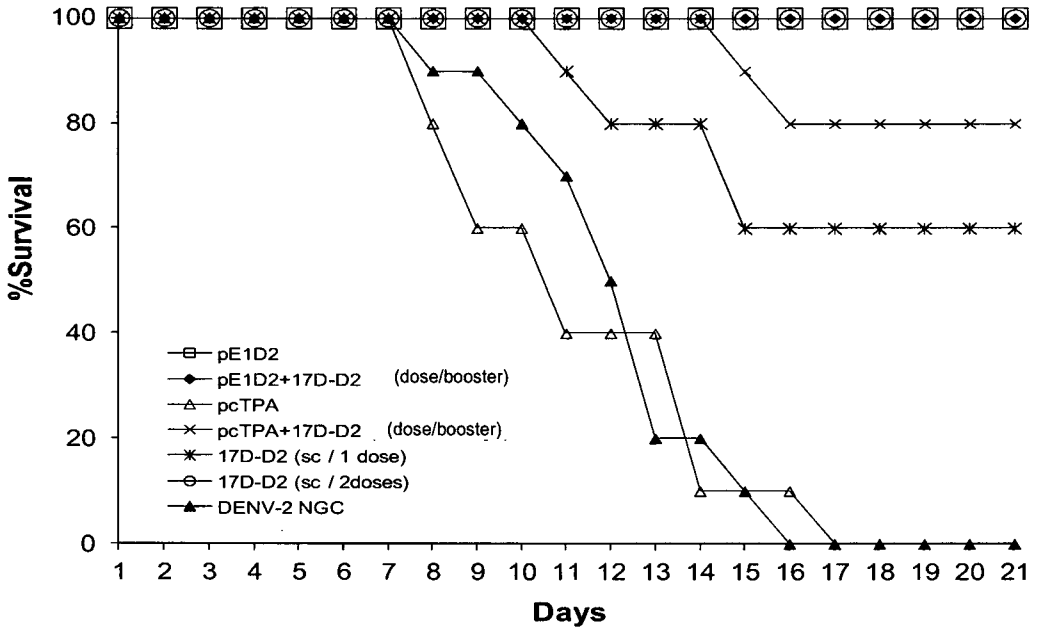
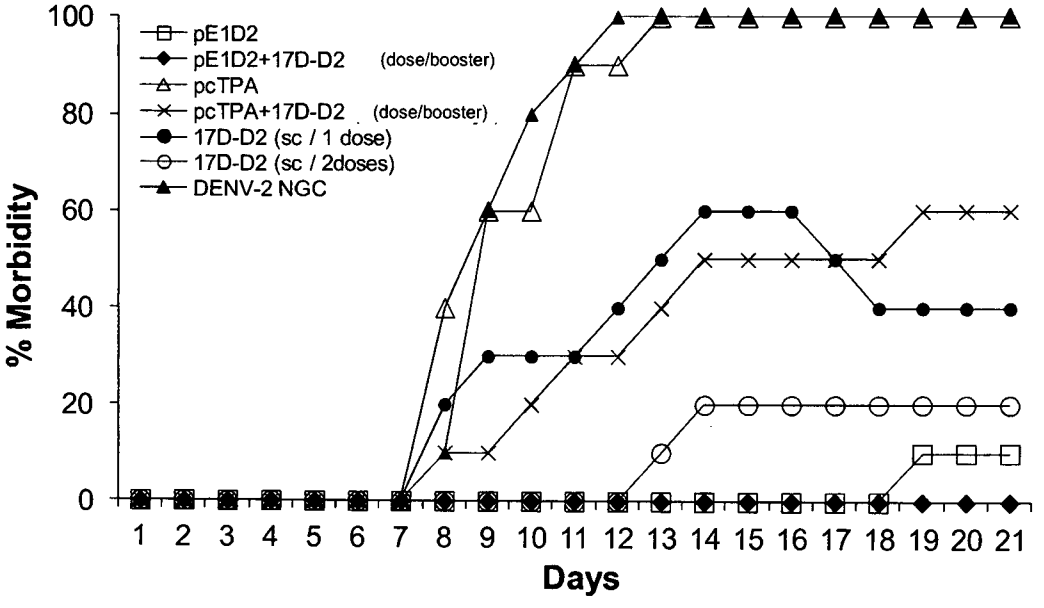


Fig. 3B



pE1D2 – 2nd Experiment

Fig. 3C

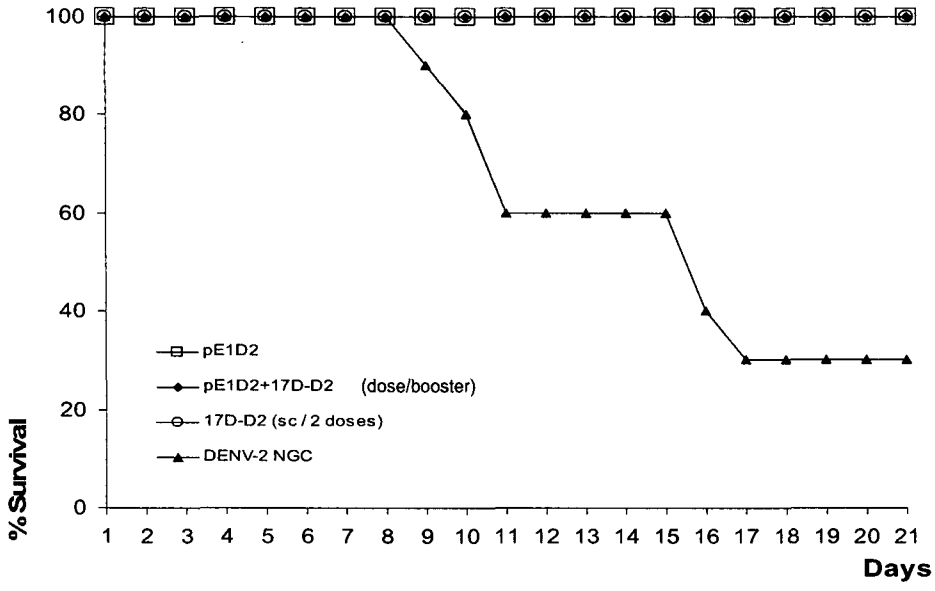
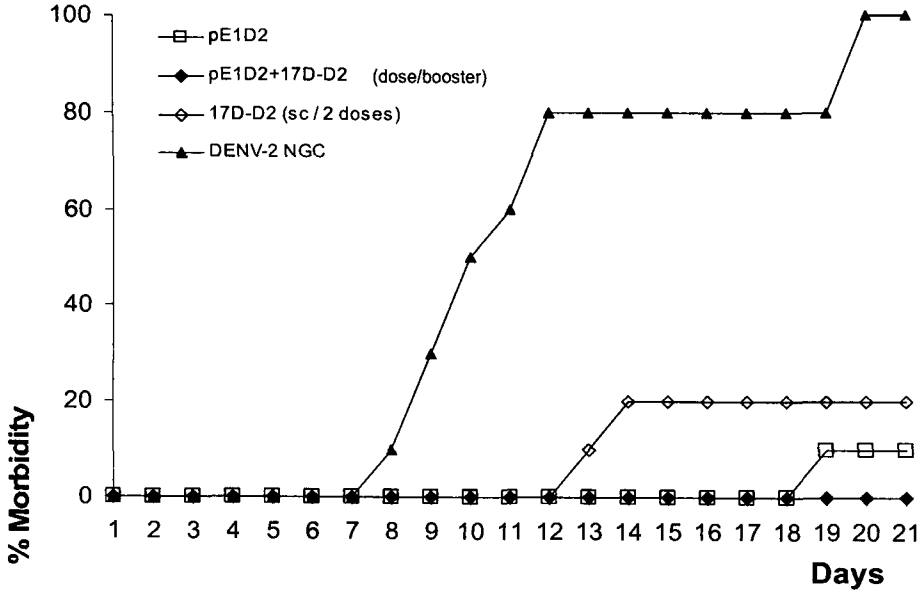


Fig. 3D



pE2D2 – 1st Experiment

Fig. 4A

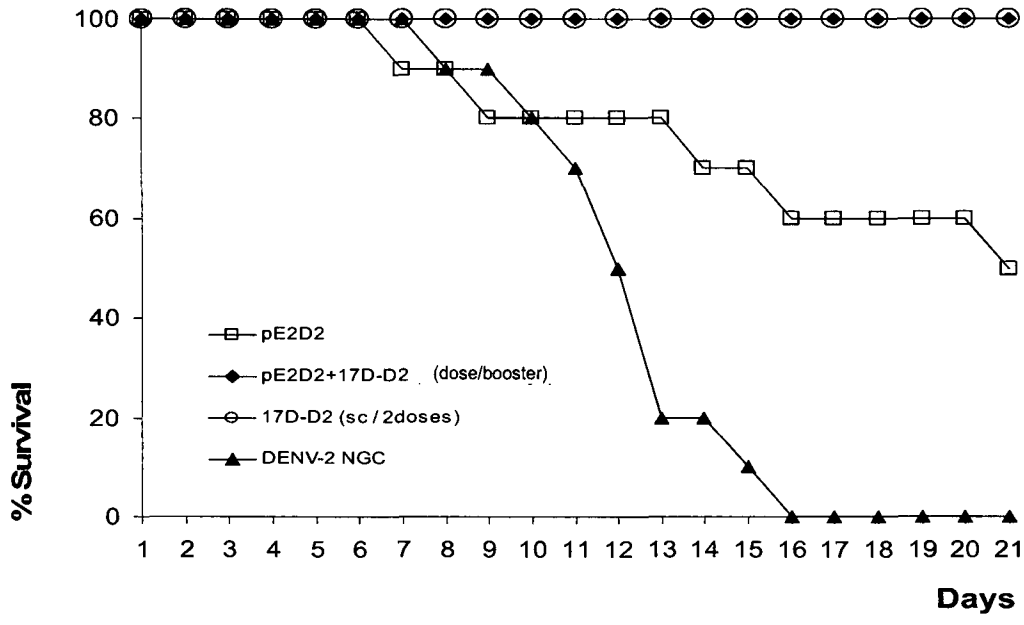
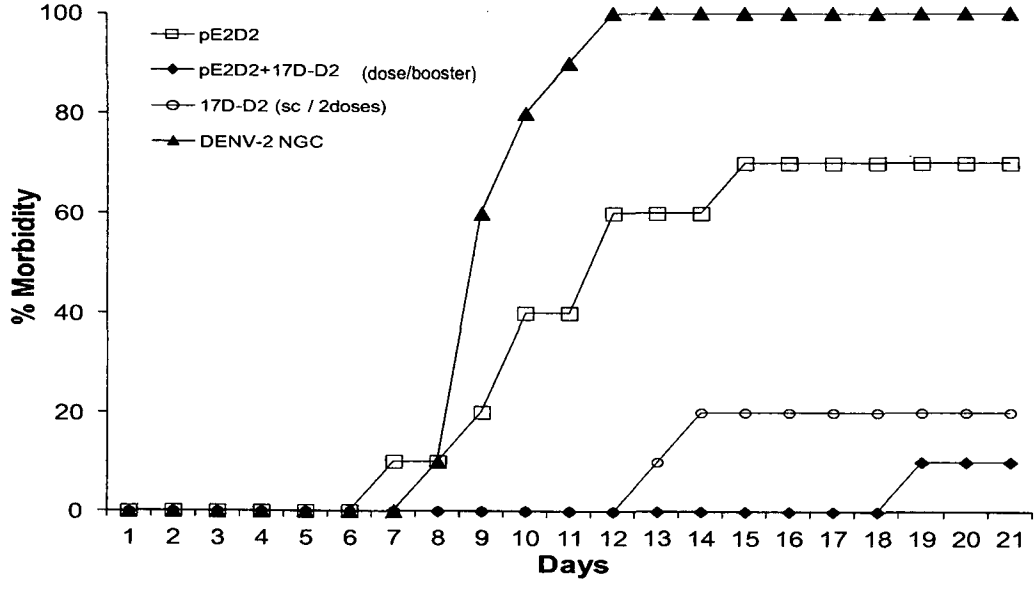


Fig. 4B



pE2D2 – 2nd Experiment

Fig. 4C

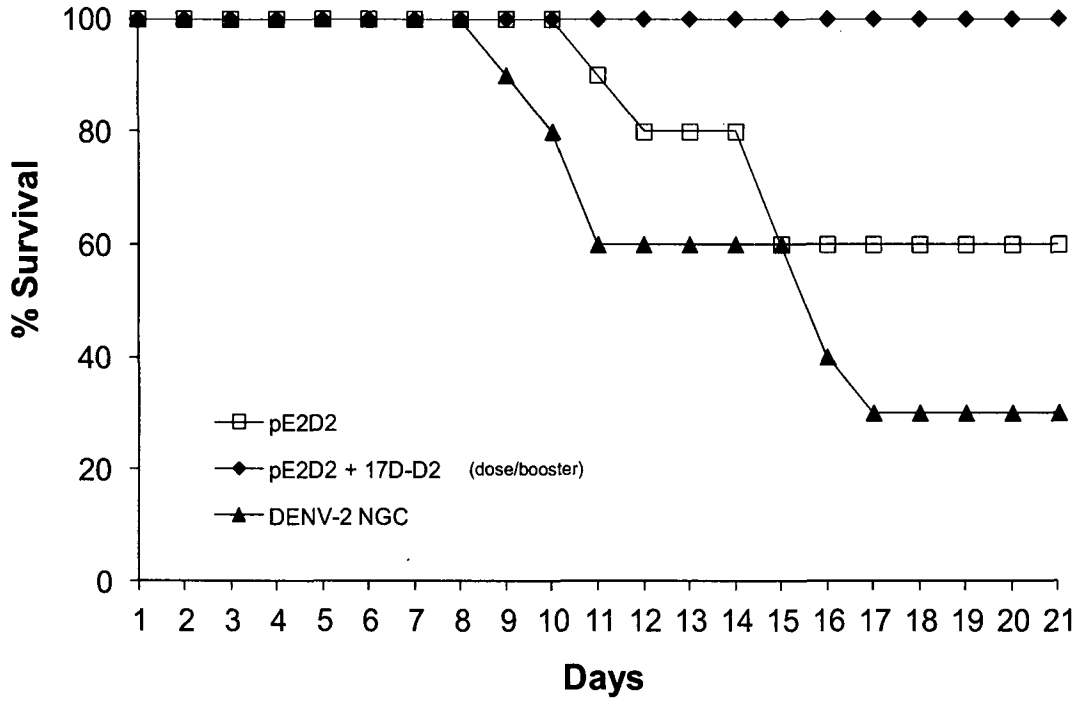
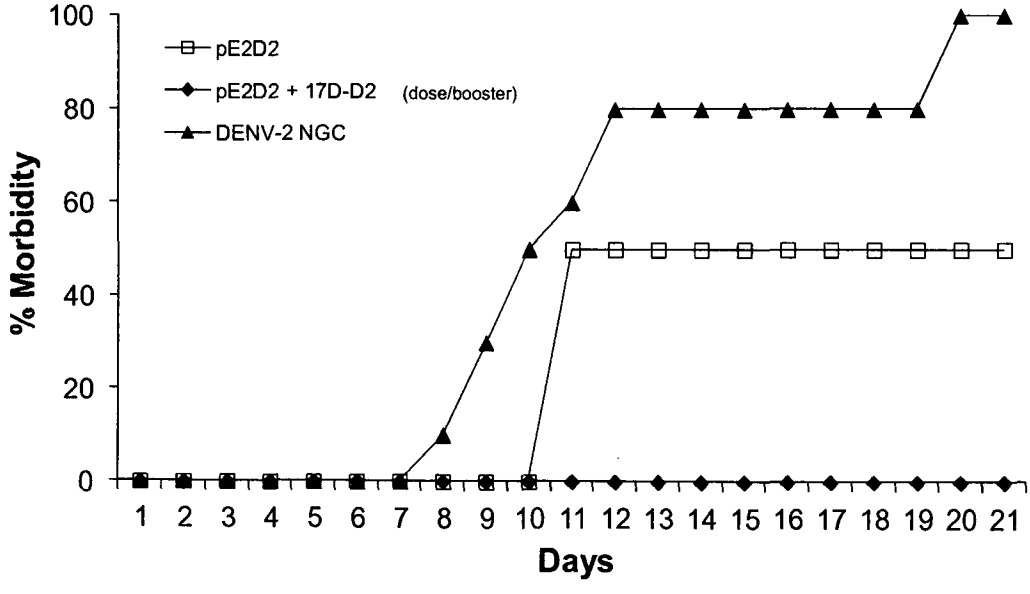


Fig. 4D



pE1D2 – 3rd Experiment (co-administration)

Fig. 5A

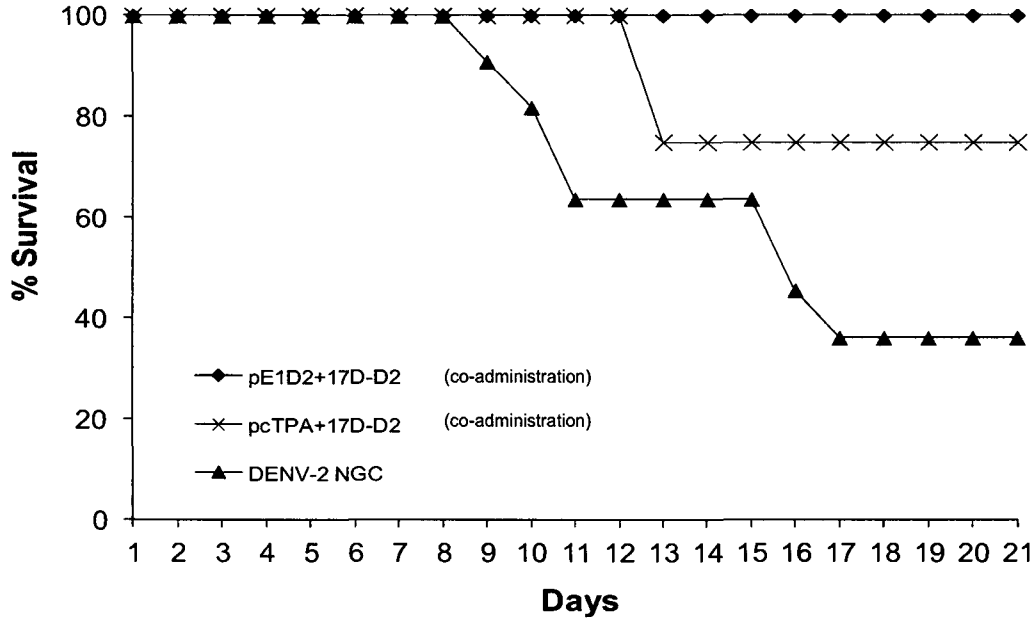
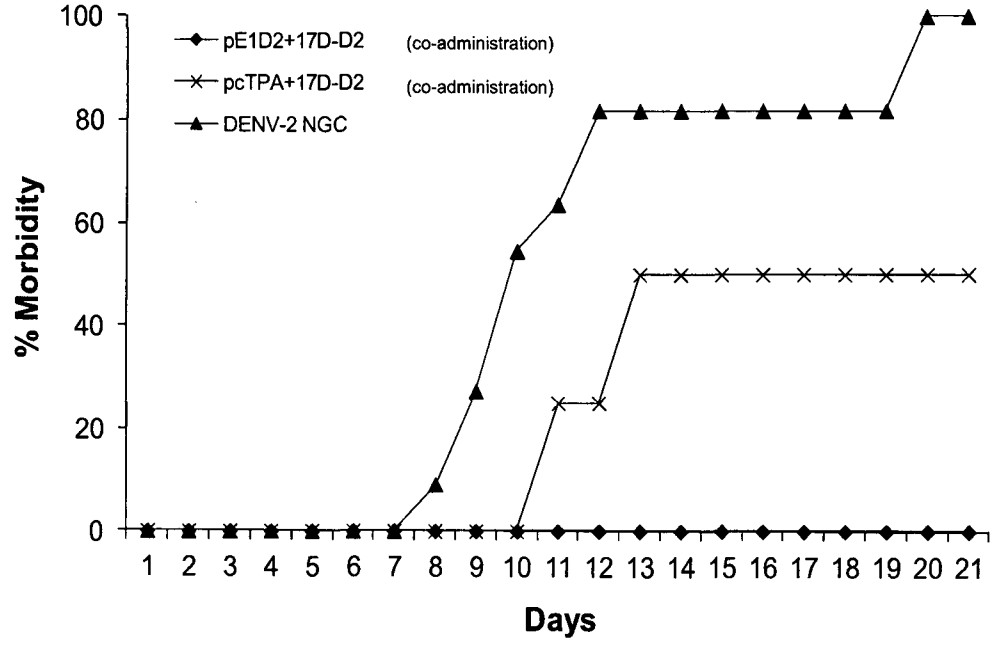


Fig. 5B



pE2D2 – 3rd Experiment (co-administration)

Fig. 5C

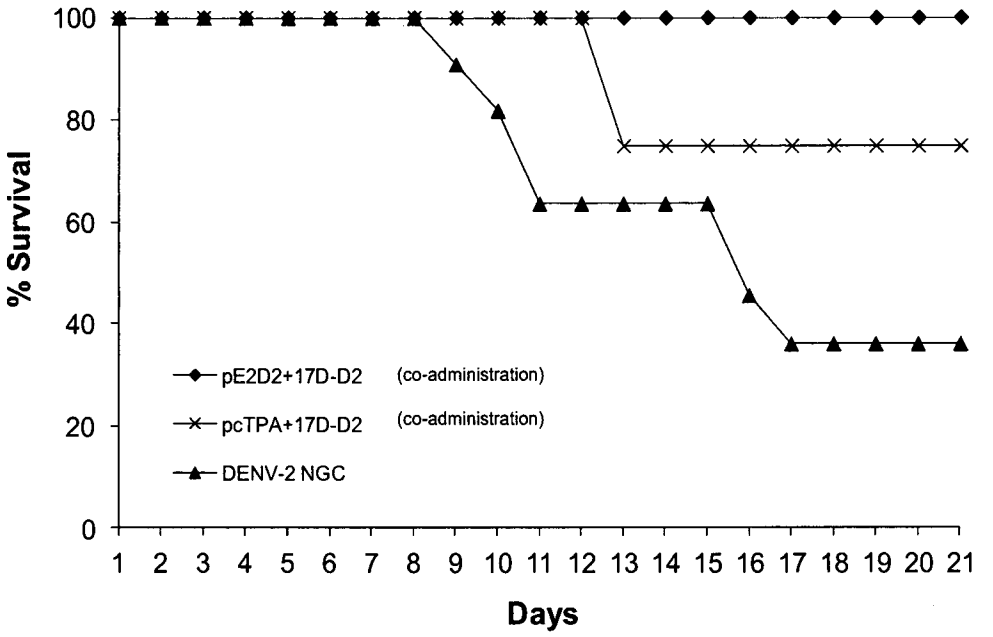
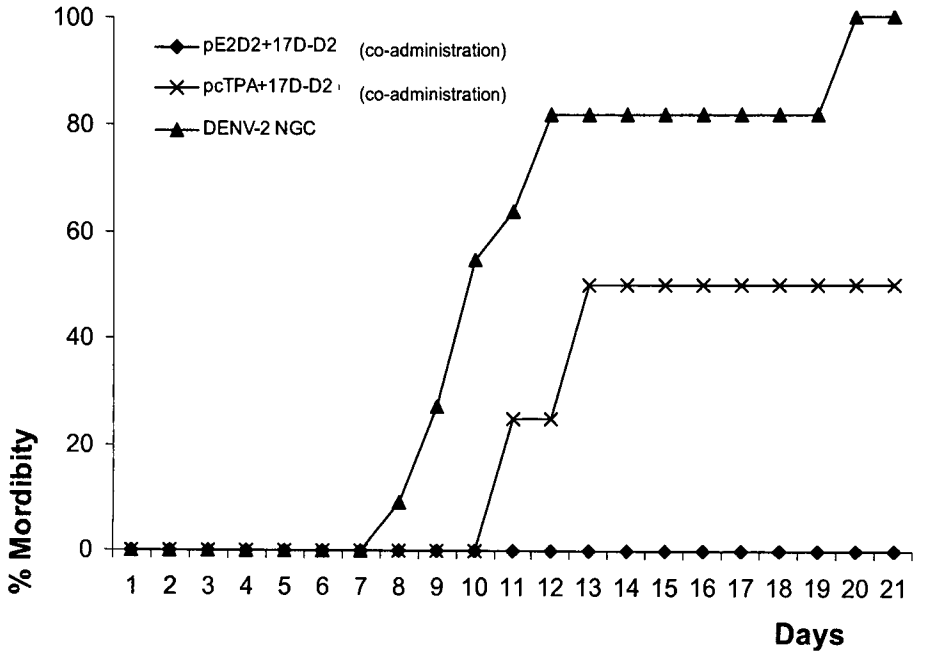


Fig. 5D



49

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 113351

Bogotá D.C., Octubre 24 de 2014 - 15:33:04

RECIBIDO DE : TRIANA URIBE & MICHELSEN LTDA NI 830.001.432

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	672813374	24/10/2014	464.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	2205 DIVISIONAL SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION CONT. DERE	464.000.00	464.000.00
				$464.000.00

SON: **CUATROCIENTOS SESENTA Y CUATRO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
*****-
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO4
No. 14-237334- -00000-0000
Fecha: 2014-10-27 15:57:22 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 49

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-069004- -00011-0000
Fecha: 2014-10-27 15:57:22 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 49