

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 444 691**

51 Int. Cl.:

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/295 (2006.01)

C07K 14/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.09.2006 E 06791279 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2013 EP 1944038**

54 Título: **Proteína de la cápside del virus del Dengue que induce una respuesta protectora y su composición farmacéutica**

30 Prioridad:

16.09.2005 CU 1682005

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

26.02.2014

73 Titular/es:

**CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA (100.0%)
Avenida 31 entre 158 y 190 Cubanacán, Playa Ciudad de la Habana 10600, CU**

72 Inventor/es:

**LAZO VÁZQUEZ, LAURA;
HERMIDA CRUZ, LISSET;
LÓPEZ ABARRATEGUI, CARLOS;
SIERRA VÁZQUEZ, BEATRIZ DE LA CARIDAD;
VÁZQUEZ RAMUNDO, SUSANA;
VALDEZ PRADO, IRIS;
GUILLÉN NIETO, GERARDO ENRIQUE;
GUZMÁN TIRADO, MARÍA GUADALUPE y
ZULUETA MORALES, AÍDA**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 444 691 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proteína de la cápside del virus del Dengue que induce una respuesta protectora y su composición farmacéutica.

- 5 El ámbito de la presente invención se define por las reivindicaciones y cualquier información que no se encuentre en las reivindicaciones se proporciona únicamente a título informativo.

10 La presente invención está relacionada con el campo de la biotecnología y la industria farmacéutica, en particular con la obtención de proteínas capaces de inducir una respuesta inmune contra la infección por el virus del Dengue, citado a partir de aquí como DEN, evitando el fenómeno de activación dependiente de anticuerpos descrito en personas re infectadas con el virus.

15 El dengue febril (DF) y el dengue hemorrágico febril (DHF) están siendo cada vez más importantes como problemas sanitarios, afectando a muchos países de las zonas tropical y subtropical de nuestro planeta. El virus del dengue se ha reconocido en más de 100 países y se estima que 2.500 millones de personas viven en áreas de riesgo. Se han comunicado entre 50 y 100 millones de casos de DF y de 250.000 a 500.000 de DHF cada año. (Guzman M.G. y Kouri G. 2002. Dengue: an update. Lancet Infect. Dis. 2: 33-42).

20 El agente causal de esta enfermedad es el virus del Dengue, que pertenece a la familia Flaviviridae, género Flavivirus, que se transmite por el mosquito *Aedes aegypti* (Leysen P., De Clerco E., Neyts J. 2000. Perspectives for the treatment of infections with Flaviviridae. Clin. Microbiol. Rev. 13: 67-82).

25 Hasta ahora se ha informado de cuatro serotipos que pueden circular en la misma región. El virus del dengue es un virus encapsulado ARN positivo, cuyo genoma contiene una fase de lectura simple que se traduce en una poliproteína que se procesa en tres proteínas estructurales y siete proteínas no estructurales. (Russell P.K., Brandt W.E., Dalrymple J.M. 1980. Chemical and antigenic structure of flaviviruses. The togaviruses: biology, structure, replication. Schelesinger R.W. (ed.). 503-529).

30 Se han hecho múltiples estudios para determinar los factores de riesgo que están implicados en la forma más grave de la enfermedad del dengue, que se caracterizan por fiebre alta, extravasación de fluidos, hemorragias y último término choque por dengue. (Gubler D.J. 1998. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. Clin. Microbiol. Rev. 11: 480-496). Uno de los factores de riesgo más importantes es la infección secundaria por un serotipo heterólogo, debido a que no hay protección cruzada entre infecciones de diferentes serotipos. (Kouri G., Guzman M.G., Bravo J., Trina C. 1989. Dengue hemorrhagic fever/ dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic. WHO Bulletin OMS. 67: 375-380).

40 Existen varias hipótesis para explicar este fenómeno, entre ellas está la de amplificación dependiente de anticuerpo. (Halstead S.B., Scanlon J.E., Umpaivit P., Udomsakdi S. 1969. Dengue and Chikungunya virus infection in man in Thailand, 1962-1964. IV. Epidemiologic studies in the Bangkok metropolitan area. Am. J. Trop. Med. Hyg. 18: 997-1021).

45 Estudios anteriores sugieren que el virus DEN se replica más en las células mononucleares de la sangre periférica de los pacientes cuando han tenido una infección previa con este virus (Halstead S.B., O'Rourke E.J., Allison A.C. 1977. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. II. Identity of blood and tissue leukocytes supporting *in vitro* infection. J. Exp. Med. 146: 218-229). Posteriormente, se ha demostrado que los anticuerpos residuales pueden ser los responsables de este efecto (Morens DM, Halstead SB, Marchette NJ. 1987. Profiles of antibody-dependent enhancement of dengue virus type 2 infection. Microb Pathog. Oct; 3(4):231-7).

50 Bajo condiciones de especificidad o concentración de anticuerpos en las cuales no se produce la neutralización, los complejos virus-anticuerpo pueden incorporarse en las células que expresan receptores FCy en las membranas, tales como monocitos y macrófagos. Este mecanismo, conocido como amplificación dependiente de anticuerpo (ADA) se produce durante las infecciones secundarias. (Morens DM, Halstead SB, Marchette NJ. 1987. Profiles of antibody-dependent enhancement of dengue virus type 2 infection. Microb Pathog. Oct;3(4): 231-7; Kliks S.C., Nimmannitya S., Nisalak A., Burke D.S. 1988. Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants. Am. J. Trop. Med. Hyg. 38: 411-419).

60 Halstead y col. (Halstead S.B., Scanlon J.E., Umpaivit P., Udomsakdi S. 1969. Dengue and Chikungunya virus infection in man-in Thailand, 1962-1964. IV. Epidemiologic studies in the Bangkok metropolitan area. Am. J. Trop. Med. Hyg. 18: 997-1021.), en un estudio de 3 años en Bangkok, Tailandia, informa de que las tasas de hospitalización por infección por DEN entre niños alcanzaba el máximo entre los 7 y 8 meses de edad. Estas tasas eran cuatro a ocho mayores que las observadas entre niños de 1-3 meses y dos veces la de niños menores de 3 años. Kliks y col. (Kliks S.C., Nimmannitya S., Nisalak A., Burke D.S. 1988. Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants. Am. J. Trop. Med. Hyg. 38: 411-419), determinaron la relación entre los títulos de anticuerpos neutralizantes maternos contra DEN-2 y la edad en trece niños con DFH causado por el virus homólogo. Los resultados mostraron que los casos graves de infección por el virus se producían cuando los niveles de los anticuerpos maternos disminuían hasta niveles subneutralizantes.

Estos datos están en consonancia con la hipótesis de que los anticuerpos maternos tienen un doble papel protegiendo inicialmente y después estimulando el desarrollo de DHF.

5 A pesar de la existencia de este fenómeno inmunológico, hoy en día los candidatos vacunales más avanzados en todo el mundo están basados en cepas víricas atenuadas de los cuatro diferentes serotipos que contienen la proteína de envoltura. Estos candidatos son potencialmente capaces de inducir anticuerpos inmunoestimulantes contra las proteínas expuestas (PrM/M y proteínas de envoltura) y anticuerpos neutralizantes protectores contra los cuatro serotipos víricos (Kanesathasan N., Sun W., Kim-Ahn G., Van Albert S., Putnak J. R., King A., Raengsakulrach B., Christ-Schmidt H., Gilson K., Zahradnik J.M., Vaughn D.W., Innis B.L., Saluzzo J.F. y Hoke C.H. 2001. Safety and immunogenicity of attenuated dengue virus vaccines (Aventis Pasteur) in human volunteers. *Vaccine*. 19: 3179-3188).

15 Si se pudiera conseguir la inducción de altos niveles de anticuerpos neutralizantes por inmunización, podría prevenirse la replicación vírica a pesar de la inducción de anticuerpos activadores. El problema se puede producir cuando no se alcanza la seroconversión completa de los cuatro serotipos en las vacunas en términos de anticuerpos neutralizantes o cuando con el paso del tiempo los anticuerpos declinan a niveles sanguíneos bajos y los individuos se convierten entonces en susceptibles a una infección secundaria grave con un serotipo vírico para el que no están presentes anticuerpos protectores. De hecho, se han realizado varios ensayos en monos y seres humanos para definir las cantidades víricas en las formulaciones vacunales. (Guirakhoo F., Arroyo J., Pugachev K.V., Miller C., Zhang Z.-X., Weltzin R., Georgakopoulos K., Catalan J., Ocran S., Soike K., Ratterree M., Monath T.P. 2001. Construction, safety, and immunogenicity in nonhuman primates of a chimeric yellow fever-dengue virus tetravalent vaccine. *J. Virol.* 75: 7290-7304).

25 En algunos casos no se alcanzaba una seroconversión equilibrada contra los cuatro serotipos (Sabchareon A, Lang J, Chanthavanich P, Yoksan S, Forrat R, Attanath P, Sirivichayakul C, Pengsaa K, Pojjaroen-Anant C, Chokejindachai W, Jagsudee A, Saluzzo JF, Bhamarapravati N. 2002. Safety and immunogenicity of tetravalent live-attenuated dengue vaccines in Thai adult volunteers: role of serotype concentration, ratio, and multiple doses. *Am J Trop Med Hyg.* 66(3): 264-72). Además, es necesario administrar hasta 3 dosis de vacuna atenuada en niños para una seroconversión completa en términos de anticuerpos neutralizantes y hace falta ver si estos perdurarán (Sabchareon A, Lang J, Chanthavanich P, Yoksan S, Forrat R, Attanath P, Sirivichayakul C, Pengsaa K, Pojjaroen-Anant C, Chambonneau L, Saluzzo JF, Bhamarapravati N. 2004. Safety and immunogenicity of a three dose regimen of two tetravalent live-attenuated dengue vaccines in five- to twelve-year-old Thai children. *Pediatr Infect Dis J.*;23(2):99-109). Este es actualmente uno de los aspectos más cuestionados en las formulaciones que incluyen la proteína de envoltura del virus del Dengue, y consecuentemente en los candidatos vacunales en desarrollo.

35 Otros inconvenientes de las vacunas atenuadas que están actualmente en fase I/II es la seguridad. Se ha demostrado en varios estudios que hay efectos adversos en adultos y niños (fiebre, mialgia, petequias y dolor de cabeza) después de la inoculación de la primera dosis (Sabchareon A, Lang J, Chanthavanich P, Yoksan S, Forrat R, Attanath P, Sirivichayakul C, Pengsaa K, Pojjaroen-Anant C, Chambonneau L, Saluzzo JF, Bhamarapravati N. 2004. Safety and immunogenicity of a three dose regimen of two tetravalent live-attenuated dengue vaccines in five- to twelve-year-old Thai children. *Pediatr Infect Dis J.*;23(2):99-109). En general, pueden producirse fenómenos de reversión de la potencial virulencia asociados con las vacunas vivas.

45 En la búsqueda de nuevas alternativas, se han desarrollado diferentes variantes de candidatos vacunales basados en la proteína de envoltura o fragmentos de la misma, que se obtienen por tecnología recombinante. Aunque estas estrategias evitan los problemas de seguridad relacionadas con la inoculación del virus vivo, representan la misma desventaja de no ser capaces de sensibilizar al individuo si la formulación no es tetravalente o si no induce una respuesta equivalente de anticuerpos neutralizantes contra los cuatro serotipos (Velzing J, Groen J, Drouet MT, van Amerongen G, Copra C, Osterhaus AD, Deubel V. 1999. Induction of protective immunity against Dengue virus type 2: comparison of candidate live attenuated and recombinant vaccines. *Vaccine*. Mar 17;17(11-12):1312-20). Además, aquellos candidatos que consiguen una respuesta específica al serotipo necesitan adyuvantes potentes para conseguir una respuesta inmunitaria suficientemente protectora, los cuales son raros o no están aprobados para su uso en seres humanos (Hermida L, Rodriguez R, Lazo L, Silva R, Zulueta A, Chinea G, Lopez C, Guzman MG, Guillen G. 2004. A dengue-2 Envelope fragment inserted within the structure of the P64k meningococcal protein carrier enables a functional immune response against the virus in mice. *J Virol Methods*. 2004 Jan;115(1):41-9).

60 La respuesta humoral de anticuerpos neutralizantes se ha estudiado extensamente en animales y se ha demostrado su efecto protector. La respuesta inmunitaria celular citotóxica como mecanismo protector en el Dengue no se ha explorado en profundidad. Por el contrario, hay varios informes en los que se ha demostrado una correlación entre la inducción de una respuesta celular y la forma más grave de la enfermedad (Rothman A.L. y Ennis F.A. 1999. Immunopathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever. *Virology*. 257: 1-6). Estos estudios se basan en la presencia de altos niveles de células T activadas en aquellos individuos que muestran DHF (Green S, Pichyangkul S, Vaughn DW, Kalayanaroj S, Nimmannitya S, Nisalak A, Kurane I, Rothman AL, Ennis FA. 1999. Early CD69 expression on peripheral blood lymphocytes from children with dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis*. 180(5):1429-35).

Se ha informado de epítomos para células T principalmente en las proteínas no estructurales (Kurane I, Zeng L, Brinton MA, Ennis FA. 1998. Definition of an epitope on NS3 recognized by human CD4+ cytotoxic T lymphocyte clones cross-reactive for dengue virus types 2, 3, and 4. *Virology*. 1998 Jan 20; 240(2): 169-74). También se han descrito epítomos en las proteínas de envoltura y de la cápside vírica (Bukowski, J. F., I. Kurane, C.-J. Lai, M. Bray, B. Falgout, and F. A. Ennis. 1989. Dengue virus-specific cross-reactive CD8 human cytotoxic T lymphocytes. *J. Virol.* 63:5086-5091; Gagnon S.J., Zeng W., Kurane I., Ennis F.A. 1996. Identification of two epitopes on the dengue 4 virus capsid protein recognized by a serotype-specific and a panel of serotype-cross-reactive human CD4+ cytotoxic T-lymphocyte clones. *J Virol.* 70: 141-147). Sin embargo, no se ha demostrado el carácter protector de algunas de estas proteínas basado solamente en la inducción de una respuesta inmunitaria celular.

En la búsqueda de candidatos vacunales que eviten el fenómeno de inmuno-amplificación, se han hecho estudios utilizando las proteínas no estructurales NS1 y NS3. En el caso de NS1 se ha conseguido algún nivel de protección en ratones inmunizados con la proteína recombinante. Resultados similares se han obtenido utilizando un ADN desnudo que contenía el gen NS1, por medio del mecanismo ADCC (Wu SF, Liao CL, Lin YL, Yeh CT, Chen LK, Huang YF, Chou HY, Huang JL, Shaio MF, Sytwu HK. 2003. Evaluation of protective efficacy and immune mechanisms of using a non-structural protein NS1 in DNA vaccine against dengue 2 virus in mice. *Vaccine*. Sep 8;21 (25-26):3919-29). Sin embargo, hay ciertos informes de su posible papel en fenómenos de autoinmunidad debido a la inducción de anticuerpos que reconocen las células endoteliales humanas (Chiou-Feng Lin, Huan-Yao Lei, Ai-Li Shiau, Hsiao-Sheng Liu, Trai-Ming Yeh, Shun-Hua Chen, Ching-Chuan Liu, Shu- Chen Chiu, and Yee-Shin Lin. 2002. Endothelial Cell Apoptosis Induced by Antibodies against Dengue Virus nonstructural Protein 1 via Production of Nitric Oxide. *J. Immunol.* 657-664).

Adicionalmente, hay un informe de protección utilizando una formulación de ADN desnudo que contiene el gen de la proteína NS3, pero se ha demostrado que esta protección estaba mediada por anticuerpos que aparecían aunque se obtenía la misma protección por inmunización pasiva (Tan CH, Yap EH, Singh M, Deubel V, Chan YC. 1990. Passive protection studies in mice with monoclonal antibodies directed against the non-structural protein NS3 of dengue 1 virus. *J Gen Virol.* 1990 Mar; 71 (Pt 3):745-9). Además, vale la pena señalar que la hipótesis de que la respuesta celular puede ser potencialmente perjudicial contra la infección por virus heterólogos se basa en estudios de epítomos contenidos en la proteína NS3 (Zivny J, DeFronzo M, Jarry W, Jameson J, Cruz J, Ennis FA, Rothman AL. 1999. Partial agonist effect influences the CTL response to a heterologous dengue virusserotype. *J Immunol.* Sep1; 163(5):2754-60).

En el caso de la proteína de la cápside del virus del dengue, no se ha comunicado ninguna prueba de la protección contra el desafío con virus de dengue letal. En el caso de flavivirus relacionados, se publicó un informe en el que los autores inocularon ratones con una formulación de ADN desnudo que contenía el gen de la proteína de la cápside de Encefalitis Japonesa (EJ). Esta formulación no indujo una respuesta protectora contra un desafío con EJ letal en ratones, a pesar de demostrarse una respuesta citotóxica (Konishi E, Ajiro N, Nukuzuma C, Mason PW, Kurane I. 2003. Comparison of protective efficacies of plasmid DNAs encoding Japanese encephalitis virus proteins that induce neutralizing antibody or cytotoxic T lymphocytes in mice. *Vaccine*. Sep 8;21 (25-26):3675-83).

La protección utilizando cápsides recombinantes solo se ha demostrado en el caso del virus del papiloma humano aunque se ha sugerido un posible papel protector en otros virus tal como en el virus de la Hepatitis C. Sin embargo, en todos los casos, son infecciones crónicas o tumores, en los que la respuesta celular citotóxica es el único medio que tiene el sistema inmune para aclarar la infección vírica (Duenas-Carrera S, Alvarez-Lajonchere L, Alvarez-Obregon JC, Herrera A, Lorenzo LJ, Pichardo D, Morales J. 2000. A truncated variant of the hepatitis C virus core induces a slow but potent immune response in mice following DNA immunization. *Vaccine*. Nov 22; 19(7-8):992-7; Suzich JA, Ghin SJ, Palmer-Hill FJ, et al. 1995. Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas. *Proc Natl Acad Sci USA*; 92: 11553-57). Estos tipos de enfermedad no corresponden con el perfil agudo que presenta el Dengue en humanos durante la infección (Vaughn D.W., Green S., Kalayanarooj S., Innis B.L., Nimmannitya S., Suntayakorn S., Endy T.P., Raengsakulrach B., Rothman A.L., Ennis F.A. y Nisalak A. 2000. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis.*181: 2-9).

La proteína de cápside en el virus del Dengue tiene un peso molecular de 9 a 12 kDa (112-127 aminoácidos) y tiene un carácter marcadamente básico debido a que el 25% de sus aminoácidos son arginina y lisina. La presencia de estos aminoácidos podría favorecer las presentaciones antigénicas al sistema inmunitario debido a la capacidad que tienen los péptidos policatiónicos para hacerlo. (Lingnau K., Egyed A., Schellack C., Mattner F, Buschle M., Schmidt W. 2002. Poly-l -arginine synergizes with oligodeoxynucleotides containing CpG-motifs (CpG-ODN) for enhanced and prolonged immune responses and prevents the CpG-ODNinduced systemic release of pro-inflammatory cytokines. *Vaccine*. 20: 3498-3508). La proteína se localiza totalmente en la estructura del virión sin ninguna región expuesta (Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, Jones CT, Mukhopadhyay S, Chipman PR, Strauss EG, Baker TS, Strauss JH. 2002. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*. Mar 8; 108(5):717-25).

Jones y col., (Christopher T. Jones, Lixin Ma, John W. Burgner, Teresa D. Groesch, Carol B. Post, y Richard J. Kuhn. 2003. Flavivirus Capsid Is a Dimeric Alpha-Helical Protein. *Journal of Virology*, p7143-7149, Vol. 77, Neo. 12)

purificaron la proteína de cápside del VD2 obtenida de manera recombinante en *Escherichia coli* (*E. coli*) y demostraron que esta proteína se comporta como un dímero en solución en ausencia de ácidos nucleicos. Su estructura secundaria principalmente tiene forma de hélices alfa y está compuesta por cuatro de estas, la más larga se encuentra en el extremo C. El extremo N no presenta una estructura definida y su eliminación no afecta a la integridad estructural de la proteína.

Esta invención describe por vez primera que la cápside del virus DEN-2, obtenida de manera recombinante en *E. coli* y con solo un 40% de pureza, es capaz de inducir una respuesta inmunitaria protectora contra el desafío con virus DEN-2 letal en ratones. Se demostró que la proteína altamente purificada retenía su capacidad protectora, la cual era sobrepasada si la inmunización de ratones se realizaba con la forma particulada de la molécula. Además, se ha demostrado que la protección que se consigue estaba mediada por las células T CD8+, un nuevo elemento considerando que los epítomos que se conocen de la cápside para células T, son reconocidos por las células T CD4+ (Gagnon SJ, Zeng W, Kurane I, Ennis FA. 1996. Identification of two epitopes on the dengue 4 virus capsid protein recognized by a serotype-specific and a panel of serotype-cross-reactive human CD4+ cytotoxic T-lymphocyte clones. *J Virol.* 70(1): 141-7; Simmons CP, Dong T, Chau NV, Dung NT, Chau TN, Thao le TT, Dung NT, Hien TT, Rowland-Jones S, Farrar J. 2005. Early T-cell responses to dengue virus epitomes in Vietnamese adults with secondary dengue virus infections. *J Virol.* 79(9):5665-75).

Adicionalmente, esta molécula recombinante se mezcló con la proteína PD5, que está formada por la proteína P64k de *Neisseria meningitidis* y el dominio III de la proteína de envoltura del virus del Dengue-2. La proteína de fusión es capaz de generar una respuesta inmunitaria altamente específica del serotipo, protectora y neutralizante, con una probabilidad baja de generar el fenómeno de activación dependiente de anticuerpos (Hermida L, Rodriguez R, Lazo L, Silva R, Zulueta A, Chinea G, Lopez C, Guzman MG, Guillen G. 2004. A dengue-2 Envelope fragment inserted within the structure of the P64k meningococcal protein carrier enables a functional immune response against the virus in mice. *J Virol Methods.* 2004 Jan; 115(1):41-9).

También se describe la obtención de una construcción genética formada por la fusión del dominio III y la proteína de cápside para alcanzar el mismo objetivo. El resultado era que las dos formulaciones en las que se combinaron la cápside y el dominio III del DEN-2 generaron una mayor respuesta linfoproliferativa en ratones que la que generaba la cápside sola, y además una mayor respuesta de anticuerpos específica para el serotipo que la generada por PD5 sola. Este último resultado demuestra la capacidad de activación inmunológica de la proteína de cápside del virus del dengue en la generación de anticuerpos por un antígeno heterólogo, un fenómeno descrito para otras cápsides recombinantes de otros virus como el virus de la hepatitis B (Alvarez JC, Guillén G. Formulations containing virus like particles as immunoenhancers by mucosal route. Cuban office of the Industrial property. CU 1998/183).

Descripción detallada de la invención

El objetivo de esta invención es obtener una proteína recombinante correspondiente a la cápside del virus del Dengue, la cual cuando se inocule en ratones genere una respuesta protectora contra la infección con el virus letal.

El gen que codifica la proteína de cápside del virus del Dengue se insertó en un plásmido que contenía el promotor del fago T5. Las células XL-1 Blue, transformadas con el plásmido recombinante, expresaron altos niveles de la proteína resultante.

Esta proteína se semipurificó hasta aproximadamente el 40% de pureza, y se utilizó como adyuvante hidróxido de aluminio para su inoculación en ratones Balb/c. Una vez al mes tras la última dosis se determinaron la respuesta antiviral por anticuerpos y la respuesta linfoproliferativa en los linfocitos esplénicos estimulados *in vitro* con el virus del dengue. Como resultado se determinó que no se inducían anticuerpos antiviricos y que había una respuesta linfoproliferativa significativa. En paralelo, se llevó a cabo el ensayo de protección en los ratones no analizados. En estos, se inoculó una dosis letal correspondiente de 100 DL₅₀ de virus del Dengue y se observaron los síntomas de la enfermedad y las muertes durante 21 días. El resultado fue de una supervivencia del 44% en los ratones inmunizados con la cápside recombinante, mientras que en el grupo control negativo todos los ratones murieron. Esta es la primera prueba de una respuesta protectora contra el virus del Dengue por la inoculación de la proteína de cápside sola.

Luego, se realizó un proceso de purificación utilizando cromatografía de alta resolución para conseguir un porcentaje de pureza > 95%.

Ambas preparaciones, la variante semipurificada y la purificada, se analizaron en cromatografía en gel y HPLC con el fin de conocer el estado de agregación de la proteína en cada muestra. En el caso de la preparación semipurificada se detectó una fracción con tiempos de retención más bajos, mientras que en la muestra purificada se detectó un tiempo de retención correspondiente a la forma dimérica de la molécula.

Con el fin de conseguir un estado de agregación de la variante purificada, se llevó a cabo un proceso de particulación *in vitro* empleando cantidades bajas de oligonucleótidos. Como resultado, se obtuvieron partículas de aproximadamente 21 nm de diámetro.

Se inocularon en ratones las variantes dimérica y particulada, ambas con una pureza de más del 95%. En la preparación dimérica se utilizaron Adyuvante de Freund e hidróxido de aluminio, mientras que en la variante particulada se utilizó solo hidróxido de aluminio como adyuvante.

5 Al igual de lo que se obtuvo con la preparación semipurificada, se detectaron altos niveles de linfoproliferación en los linfocitos esplénicos estimulados *in vitro* con el virus del dengue. Al realizar el ensayo de protección, se determinó que con la variante pura dimérica se alcanzaban niveles de protección del 40 y 20% cuando el adyuvante era adyuvante de Freund y aluminio, respectivamente, sin embargo, la proteína pura particulada con aluminio como adyuvante indujo un porcentaje de protección mayor.

10 Estos resultados junto con los obtenidos con la proteína semipurificada muestran la capacidad de la proteína de cápside para inducir una respuesta protectora en ratones Balb/c, y a su vez demuestra que la forma particulada de la proteína es superior permitiendo además su utilización futura en seres humanos debido al uso de hidróxido de aluminio como adyuvante. Además, la falta de inducción de una respuesta de anticuerpos antivíricos elimina el fenómeno de activación dependiente de anticuerpos como factor de riesgo para que se produzca la forma más grave de la enfermedad: El dengue hemorrágico febril.

20 Con el fin de determinar el posible mecanismo de protección, que no esté relacionado con la inducción de anticuerpos como se demostró por su ausencia, se llevó a cabo un estudio de agotamiento de células CD8+, un marcador presente en las células T citolíticas. El resultado fue que la protección que se alcanzaba con las proteínas puras de cada variante dependía de la presencia de las células que tenían este marcador, mientras que su eliminación abolió el efecto protector inducido.

25 Adicionalmente, se llevó a cabo un estudio con el fin de conocer si la combinación de la cápside particulada recombinante con otros antígenos que indujeran una respuesta humoral no afectaba la generación de la respuesta linfoproliferativa y para conseguir una mezcla de inmunógenos capaces de contribuir a ambas ramas de la respuesta inmunitaria. En este extremo, inoculamos la variante purificada particulada de la cápside y una proteína de fusión que contenía el dominio III de la proteína de envoltura del virus del dengue-2 que era capaz de generar una respuesta inmune específica del serotipo minimizando también el fenómeno de ADA (Hermida L, Rodriguez R, Lazo L, Silva R, Zulueta A, Chinea G, Lopez C, Guzman MG, Guillen G. 2004. A dengue- 2 Envelope fragment inserted within the structure of the P64k meningococcal protein carrier enables a functional immune response against the virus in mice. J Virol Methods. 2004 Jan; 115(1):41-9). La administración de tres dosis y el análisis de los anticuerpos producidos demostraron que se había activado la inducción de anticuerpos antivíricos específicos de serotipo como resultado de la inoculación de la proteína de fusión. A su vez, se detectó una respuesta linfoproliferativa mayor que la inducida por la cápside sola y significativamente mayor que la inducida solamente por la proteína de fusión.

40 En paralelo, para saber si era posible obtener el efecto de la combinación por medio de fusión genética de ambos antígenos, se construyó un plásmido que contenía el dominio III de la proteína de envoltura del virus DEN-2 fusionado con el extremo N del gen de la proteína de cápside. La proteína resultante, con una pureza del 40%, también generó en ratones Balb/c una respuesta linfoproliferativa mayor que la obtenida por la cápside sola y una respuesta de anticuerpos específicos de serotipo mayor que la inducida por la PD5.

Descripción de las figuras

45 **Figura 1.** Estrategia de clonación de la proteína de cápside del virus DEN-2: Fragmento de la proteína de cápside de DEN-2.

Figura 2. Análisis por SDS-PAGE al 15% del proceso de semipurificación de PDC-2. 1. Ruptura del sobrenadante. 2 y 3. Fracción no adsorbida a *Q sepharosa FF*. 4. Fracción eluída con NaCl 1M.

50 **Figura 3.** Análisis por SDS-PAGE al 15% del proceso de purificación de la PDC-2. 1. Ruptura del sobrenadante, 2. Fracción no adsorbida al gel, 3. Lavado (NaCl 350 mM), 4. Fracción eluída (NaCl 750 mM), 5. Fracción en Tris 10 mM, EDTA 1 mM.

Figura 4. Perfil cromatográfico en Superdex 200 de las preparaciones semipurificada (A) y pura (B) de PDC-2.

Figura 5. Fotos de microscopía electrónica de la preparación de PDC-3 pura antes (A) y después (B) del tratamiento con oligonucleótidos.

55 **Figura 6.** Estrategia de clonación de la proteína de cápside del virus DEN-1 para generar PDC-1. DEN-1 C: Fragmento de la proteína de cápside de DEN-1.

Figura 7. Análisis por SDS-PAGE al 15% del proceso de semipurificación de PDC-1. 1. Marcador de peso molecular, 2. Ruptura del sobrenadante, 3. Fracción no adsorbida a *Q sepharosa FF*.

60 Ejemplos

EJEMPLO 1. Clonación y expresión de PDC-2.

65 La secuencia de nucleótidos que codifica los aminoácidos 1 a 99 de la proteína de cápside del virus DEN-2 (Secuencia N° 3), se amplificó con los oligonucleótidos identificados en la lista de secuencias como Secuencia N° 1 y Secuencia N° 2 de la cepa de virus DEN-2 genotipo Jamaica (Deubel V., Kinney R.M., Trent D.W. Nucleotide

sequence and deduced amino acid sequence of the nonstructural proteins of Dengue type 2 virus, Jamaica genotype: Comparative analysis of the full-length genome. *Virology* 1988.165:234-244).

5 Se creó el vector por digestión del plásmido pQE-30 con *BamHI/HindIII*, que contiene el promotor del fago T5 y una cola histidina-6 en la región del extremo N (Secuencia N° 6). Después de la unión, se analizaron los recombinantes potenciales por digestión de enzimas de restricción y los clones positivos se secuenciaron para comprobar las uniones.

10 Se transformaron células XL-1 Blue competentes (Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166:557-580) con el clon seleccionado llamado pDC-2 (Fig. 1 y Secuencia N° 4). Las cepas transformadas de *E. coli* se cultivaron en medio de Luria Bertani (LB) suplementado con Ampicilina a 50 µg/ml de durante 10 h a 37 °C. Se utilizó isopropil-B-D-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 1 mM para inducción del promotor. Tras el crecimiento de la colonia, se hizo un SDS-PAGE del lisado celular. Como resultado se obtuvo una banda de 15-kDa. Se reconoció la proteína por un fluido ascítico hiperinmune anti-DEN-2 (HMAF).
15 Esta proteína se denominó PDC-2 (Secuencia N° 5).

EJEMPLO 2. Semipurificación y caracterización de PDC-2.

20 La biomasa que se obtuvo de la cepa de *E. coli* transformada con pDC-2 y cultivada a 37 °C se destruyó con la prensa de French. Se obtuvo la proteína recombinante distribuida por igual entre las fracciones soluble e insoluble. La fracción soluble se sometió a una cromatografía de intercambio aniónico, utilizando una columna de *Q sepharosa FF* y tampón Tris 10 mM a pH 8. Se obtuvo la proteína de la fracción no adsorbida con una pureza del 40% y se utilizó para los estudios inmunológicos (Fig. 2).

25 EJEMPLO 3. Evaluación inmunológica de la PDC-2 semipurificada.

Se utilizaron tres grupos de 30 ratones Balb/c. Dos de ellos se inmunizaron con 10 µg de la proteína recombinante por vía intraperitoneal, utilizando adyuvante de Freund (AF) en uno de los grupos e hidróxido de aluminio en el otro. La fracción soluble resultante de la ruptura de las células transformadas con el pQE-30 se utilizó como control negativo utilizando el AF; se extrajo sangre a 10 animales 15 días después de la tercera dosis y se determinaron los títulos de anticuerpos contra DEN-2 por ELISA. Después de la inmunización con la proteína recombinante, formulada con ambos adyuvantes, no se obtuvieron títulos de anticuerpos.
30

Tabla 1. Títulos de anticuerpos contra DEN-2 en los sueros obtenidos tras la inmunización de ratones con PDC-2 semipurificada

Ratón	Títulos contra DEN-2 por ELISA		
	PDC-2 A. Freund	PDC-2 Hidróxido de Aluminio	XL-1 Blue Freund (Control Neg.)
1	< 1:100	< 1:100	< 1:100
2	< 1:100	< 1:100	< 1:100
3	< 1:100	< 1:100	< 1:100
4	< 1:100	< 1:100	< 1:100
5	< 1:100	< 1:100	< 1:100
6	< 1:100	< 1:100	< 1:100
7	< 1:100	< 1:100	< 1:100
8	< 1:100	< 1:100	< 1:100
9	< 1:100	< 1:100	< 1:100
10	< 1:100	< 1:100	< 1:100

35 EJEMPLO 4. Ensayo de protección.

Para la evaluación de la protección conferida a los ratones contra el desafío con virus DEN letal homólogo por la inmunización con las variantes descritas, se utilizaron 10 ratones de cada uno de los grupos inmunizados con la proteína recombinante adsorbida en hidróxido de aluminio y con la preparación de control. Cada animal recibió una
40 dosis de 100 DL₅₀ de virus DEN-2 letal por inoculación intracraneal y se observaron durante 21 días para obtener los porcentajes de letalidad en términos de muerte por encefalitis vírica. Como control positivo, se utilizó un grupo de 10 ratones inmunizados con el virus DEN-2 infeccioso (104 ufp). Todos los ratones en el control positivo sobrevivieron, mientras que en el grupo de control negativo todos los ratones estaban enfermos en los días 7-11 después del desafío y se obtuvo el 100% de mortalidad al día 21. Finalmente, el grupo inmunizado con la proteína PDC-2
45 recombinante presentaron un 44,4% de protección (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentaje de supervivencia en ratones inmunizados con PDC-2 en el desafío con el virus del Dengue homólogo letal.

Inmunógeno	Porcentaje de supervivencia
XL-1 Blue	0
DEN-2	100
PDC-2 alum.	44,4

* Se calculó como: (nº de supervivientes) / (nº total de ratones). Los datos de supervivientes se tomaron 21 días después del desafío.

EJEMPLO 5. Respuesta linfoproliferativa

- 5 El resto de los animales del grupo inmunizado con la proteína de cápside con hidróxido de aluminio como adyuvante se sacrificaron 30 días después de la última dosis. Luego se extrajeron sus bazos y se estudió la respuesta linfoproliferativa al DEN-2. Los resultados de la tabla 3 muestran los índices de estimulación obtenidos.

Tabla 3. Índices de estimulación de los linfocitos de ratones inmunizados contra el serotipo homólogo.

	PDC-2 Hidróxido de aluminio
DEN-2 **	8*
Antígeno Control***	1,5
PHA****	7

* Índice de estimulación: Cociente medio de recuentos / minutos de las muestras entre recuentos / minutos de la síntesis espontánea de ADN control.
 ** Preparación de cerebros de ratones infectados con DEN-2.
 *** Preparación de cerebros de ratones no infectados
 **** Phytohemaglutinina Mitogen (Control Positivo),

10 EJEMPLO 6. Purificación de PDC-2

- La biomasa obtenida de la cepa de *E. coli* transformada con pDC-2 y cultivada a 37 °C se destruyó con la prensa de French. La proteína recombinante se obtuvo distribuida por igual entre las fracciones soluble e insoluble. La fracción soluble se sometió a cromatografía de intercambio catiónico, utilizando una columna de *SP-Sepharosa FF*, y el tampón Tris 10 mM, Tween al 0,5%, urea 7 M, a un pH de 8. La columna se lavó con tampón de dietanolamina 30 mM, NaCl 350 mM, a pH 10,3. Una vez que estaba eluida la proteína, el tampón se cambió utilizando columnas G-25. Finalmente, la proteína se obtuvo con un 96% de pureza en tampón Tris 10 mM, EDTA 1 mM (Figura 3).

20 EJEMPLO 7. Caracterización de las variantes semipurificada y purificada

- Con el objetivo de caracterizar el estado de agregación de las preparaciones semipurificada y purificada, se hicieron cromatografías de filtración en gel utilizando la columna TSK-5000 (Tosoh bioscience, Japón). Después de aplicar la muestra semipurificada, se obtuvo un pico homogéneo principal, con un tiempo de retención variando de 15 a 20 minutos, probando la presencia de especies de alto peso molecular (Figura 4A). Por el contrario, en la muestra de la fracción altamente purificada de la proteína de cápside, se detectaron tiempos de retención de 30 minutos, correspondientes a la forma dimérica de la molécula (Figura 4B).

EJEMPLO 8. Estudios de reparticulación "in vitro".

- 30 Con el fin de reparticular la proteína de cápside en forma dimérica pura, se cambió el tampón a Hepes 25 mM, KAc 100 mM, MgAc₂ 1,7 mM, a pH 7,4. Después de calentar la proteína y la mezcla de oligonucleótidos durante 1 min a 37 °C, se incubaron en un volumen igual durante 30 min a 30 °C. Como control negativo del experimento, se incubó la proteína sin los oligonucleótidos. Cuando ambas preparaciones se observaron con un microscopio electrónico, se observó una gran cantidad de partículas de aproximadamente 21 nm de diámetro, en la muestra de la proteína previamente incubada con la mezcla de oligonucleótidos, mientras que en la muestra control no se observaron partículas (Figura 5).

EJEMPLO 9. Evaluación inmunológica de la cápside purificada en ratones.

- 40 Se utilizaron cinco grupos de 20 ratones Balb/c. Dos de ellos se inmunizaron con 10 ug de la proteína dimérica purificada recombinante por vía intraperitoneal, utilizando hidróxido de aluminio y adyuvante de Freund. Otro grupo se inmunizó con 10 ug de proteína de cápside purificada y particulada con hidróxido de aluminio como adyuvante. La fracción soluble de la ruptura de las células *XL-1 blue* transformadas con el plásmido pQE-30 y sometidas a las mismas etapas de purificación que PDC-2 se utilizaron como control negativo, con adyuvante de Freund. El quinto grupo se inmunizó con virus DEN-2 como control positivo. Un mes después de la última dosis 10 animales de cada

grupo recibió una dosis de 100 DL₅₀ de DEN-2 letal por inoculación intracraneal y se observaron durante 21 días para obtener los porcentajes de supervivencia. Todos los ratones del grupo control positivo sobrevivieron, mientras que en el grupo control negativo todos los ratones estaban enfermos sobre el día 7-11 después del desafío y se obtuvo una mortalidad del 0%. Finalmente, en los grupos inmunizados con la proteína recombinante, el grupo inmunizado con la PDC-2 dimérica pura presentó un 20% de protección cuando se utilizó hidróxido de aluminio como adyuvante y un 40% de protección cuando se utilizó adyuvante de Freund. Adicionalmente, en el grupo que recibieron la proteína pura reparticulada con hidróxido de aluminio como adyuvante, el 90% de los ratones estaban protegidos (Tabla 4).

Tabla 4. Porcentaje de supervivencia en ratones inmunizados con las variantes proteicas ensayadas en el desafío con virus homólogo del Dengue letal.

Inmunógeno (adyuvante)	Porcentaje de supervivencia*
XL-1 Blue (Freund)	0
PDC-2 Pura y dimérica (Aluminio)	20
PDC-2 Pura y dimérica (Freund)	40
PDC-2 Pura y reparticulada (Aluminio)	90
DEN-2	100

* Se calculó: (nº de supervivientes) / (nº total de ratones). Los datos de supervivientes se tomaron 21 días después del desafío.

EJEMPLO 10. Respuesta proliferativa

El resto de los animales de los grupos inmunizados con la proteína de cápside (10 animales), tanto dimérica como reparticulada, con hidróxido de aluminio como adyuvante, se sacrificaron 15 días después de la última dosis. Luego se extrajeron sus bazo y se estudió la respuesta linfoproliferativa al DEN-2. Los resultados de la tabla 5 muestran los índices de estimulación que se obtuvieron.

Tabla 5. Índices de estimulación de los linfocitos de ratones inmunizados contra el serotipo homólogo.

	PDC-2 Pura y reparticulada	PDC-2 Pura
DEN-2 **	10*	4
Antígeno Control***	1,5	1,2
PHA****	7	8

* Índice de estimulación: Cociente medio de recuentos / minutos de las muestras entre recuentos / minutos de la síntesis espontánea de ADN control.
 ** Preparación de cerebros de ratones infectados con DEN-2.
 *** Preparación de cerebros de ratones no infectados
 **** Phytohemaglutinina Mitogen (Control Positivo),

EJEMPLO 11. Evaluación inmunológica de la muestra formada por PD5 y PDC-2

Veinte animales se inocularon con la mezcla de 10 ug de la proteína pura particulada y 20 ug de proteína PD5 (Secuencia N° 23) en tres dosis espaciadas quince días. Aparte, se utilizaron como controles, un grupo inmunizado con 10 ug de la proteína pura de cápside, un grupo inmunizado con 20 ug de proteína PD5 mezclado con el volumen equivalente de PDC-2 pero obtenido de un control negativo en curso y un grupo inmunizado con proteína P64k, la proteína portadora presente en la construcción de PD5. En todos los casos se utilizó el hidróxido de aluminio como adyuvante.

Quince días después de la última dosis, se extrajo sangre de los animales y se ensayaron los anticuerpos antivirales en los sueros por ELISA. Como se muestra en las tablas 6 y 7, el grupo inmunizado con la mezcla desarrolló anticuerpos específicos de serotipo con títulos más altos que los del grupo inmunizado solo con la proteína PD5 y, al mismo tiempo, los títulos en estos dos grupos eran mayores que los del grupo inmunizado con proteína PDC-2, en la que no se detectaron anticuerpos contra virus DEN-2. Las células de los bazo de estos animales se extrajeron y se estimularon con el virus DEN-2 infeccioso. Como se muestra en la tabla 8, en el grupo inmunizado con la mezcla, los índices de estimulación eran mayores que los del grupo inmunizado solo con la proteína de cápside. Los índices de estimulación más bajos se obtuvieron en el grupo inmunizado con proteína PD5.

Tabla 6. Títulos de anticuerpos contra virus DEN-2 en sueros obtenidos después de la inmunización

Ratón	Grupos inoculados con:			
	PDC-2	PDC-2 / PD5	PD5	P64k
1	< 1:100	< 1:128000	< 1:64000	< 1:100
2	< 1:100	< 1:320000	< 1:32000	< 1:100
3	< 1:100	< 1:320000	< 1:64000	< 1:100
4	< 1:100	< 1:320000	< 1:16000	< 1:100
5	< 1:100	< 1:64000	< 1:64000	< 1:100
6	< 1:100	< 1:128000	< 1:128000	< 1:100
7	< 1:100	< 1:64000	< 1:64000	< 1:100
8	< 1:100	< 1:128000	< 1:32000	< 1:100
9	< 1:100	< 1:320000	< 1:64000	< 1:100
10	< 1:100	< 1:320000	< 1:32000	< 1:100

Tabla 7. Determinación de la especificidad de serotipo de los anticuerpos contenidos en las mezclas de los sueros obtenidos de cada grupo

Antígeno Vírico	Grupos inoculados con:			
	PDC-2	PDC-2 / PD5	PD5	P64k
DEN-1	< 1:100	< 1:200	< 1:200	< 1:100
DEN-2	< 1:100	< 1:320 000	< 1:64000	< 1:100
DEN-3	< 1:100	< 1:200	< 1:200	< 1:100
DEN-4	< 1:100	< 1:200	< 1:200	< 1:100

Tabla 8. Índices de estimulación de los linfocitos de ratones inmunizados contra el serotipo homólogo.

	PDC-2	PDC-2 / PD5	PD5	P64k
DEN-2 **	9*	11	2,1	1,1
Antígeno*** Control (-)	1,3	1,6	1,5	1,2
PHA****	7,5	7,3	7,9	8

* Índice de estimulación: Cociente medio de recuentos / minutos de las muestras entre recuentos / minutos de la síntesis de ADN espontánea control.
 ** Preparación de cerebros de ratones infectados con DEN-2.
 *** Preparación de cerebros de ratones no infectados
 **** Phytohemaglutinina Mitogen (Control Positivo),

5

EJEMPLO 12. Estudios de agotamiento de CD8

Se inocularon las proteínas de cápside reparticuladas y diméricas en ratones Balb/c para obtener alguna prueba de la inducción de la respuesta inmunitaria celular. Se empleó una preparación obtenida de las células transformadas con el plásmido utilizado para generar el pDC-2, y por un proceso de purificación similar al utilizado para la proteína PDC-2 como control negativo.

10

Se administraron 3 dosis de la proteína (20 ug) a grupos de 20 animales, utilizando hidróxido de aluminio como adyuvante. Un mes después de la última dosis, se administró a la mitad de los animales de cada grupo, 1 mg de mAc de rata anti-CD8 de ratón, capaz de agotar las células del sistema inmune del ratón que contienen este marcador. Al día siguiente, todos los animales se desafiaron con 100 DL₅₀ (dosis letal media) de virus DEN-2. Se observó la aparición de signos de enfermedad y se registraron las muertes.

15

En el caso de los grupos inmunizados no tratados, se obtuvo un 20 y un 80% de protección en los grupos inmunizados con la proteína de cápside dimérica y la reparticulada, respectivamente. Paralelamente, en los grupos tratados el porcentaje de protección fue menor que en los grupos tratados: un 0% de protección para la PDC-2 dimérica y un 10% de protección para la proteína reparticulada. En el caso del grupo control negativo no se obtuvo ninguna protección ni en los animales tratados ni en los no tratados.

20

Tabla 9. Ensayo de desafío con virus DEN-2 letal en animales inmunizados con variantes de la cápside recombinante

Grupos	*Porcentajes de supervivencia en ratones tratados con el mAc anti-CD8	Porcentajes de supervivencia en ratones no tratados con el mAc anti-CD8
PCD12 reparticulada	10	80
PCD12 no particulada	0	20
Control (-)	0	0

* Se calculó: (nº de supervivientes) / (nº total de ratones). Los datos de los supervivientes se tomaron 21 días después del desafío.

EJEMPLO 13: Obtención y semipurificación de la proteína de DEN-1.

- 5 La secuencia de nucleótidos que codifica los aminoácidos 1 a 100 de la proteína de la cápside del virus DEN-1 (Secuencia Nº 7), se amplificó con los oligonucleótidos identificados en la lista de secuencias como Secuencia Nº 8 y Secuencia Nº 10 de la cepa vírica DEN-1. Se generó el vector por digestión con *Bam*HI/*Hind*III del plásmido pQE-30, que contenía el promotor del fago T5 y una cola histidina 6 en la región del extremo N (Secuencia Nº 6). Tras la unión, se analizaron los recombinantes por restricción y los clones positivos se secuenciaron para comprobar las uniones. Se transformaron células XL-1 Blue competentes (Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166:557-580) con el clon seleccionado llamado pDC-1 (Figura 6 y Secuencia Nº 10). Las cepas de *E. coli* transformadas se cultivaron en LB suplementado con Ampicilina a 50 µg/ml durante 10 h a 37 °C. Se utilizó isopropil-B-D-tiogalactopiranosido (IPTG) hasta una concentración final de 1 mM para la inducción del promotor. Tras el crecimiento de la colonia, se realizó un SDS-PAGE del lisado celular. Como resultado se obtuvo una banda a 15-kDa. Se reconoció la proteína con un HMAF anti-DEN-1. Esta proteína se denominó PDC-1 (Secuencia Nº 11).

EJEMPLO 14. Semipurificación y caracterización de PDC-1.

- 20 La biomasa obtenida de la cepa de *E. coli* transformada con pDC-1 y cultivada a 37 °C se destruyó con una prensa de French. La proteína recombinante se obtuvo distribuida por igual entre las fracciones soluble e insoluble. Se hizo una cromatografía de intercambio aniónico de la fracción soluble, utilizando una columna de *Q sepharosa FF* y el tampón Tris 10 mM a pH 8. La proteína de la fracción no adsorbida se obtuvo con un 45% de pureza, y se utilizó para los estudios inmunológicos.

EJEMPLO 15. Evaluación inmunológica de la PDC-1 semipurificada.

- 30 Se utilizaron dos grupos de 30 ratones Balb/c. Uno de ellos se inmunizó con 10 µg de la proteína recombinante por vía intraperitoneal, utilizando hidróxido de aluminio como adyuvante. La fracción soluble resultante de la ruptura de las células transformadas con el pQE-30 y con el adyuvante hidróxido de aluminio se utilizó como control negativo. Se sacó la sangre de una parte de los animales (10 ratones) 15 días después de la tercera dosis y se determinaron por ELISA los títulos de anticuerpos contra DEN-1. Tras la inmunización con la proteína recombinantes, no se obtuvo ningún título de anticuerpos antivirales.

Tabla 10. Títulos de anticuerpos contra DEN-1 de los sueros obtenidos tras la inmunización con PDC-1 semipurificada

Ratón	Títulos Anti-DEN-1 por ELISA	
	XL-1 Blue Control (-)	PDC-1
1	< 1:100	< 1:100
2	< 1:100	< 1:100
3	< 1:100	< 1:100
4	< 1:100	< 1:100
5	< 1:100	< 1:100
6	< 1:100	< 1:100
7	< 1:100	< 1:100
8	< 1:100	< 1:100
9	< 1:100	< 1:100
10	< 1:100	< 1:100

EJEMPLO 16. Ensayo de protección

Para la evaluación de la protección conferida a los ratones contra el desafío con virus homólogo DEN letal por la inmunización con las variantes descritas, se utilizaron 10 ratones de cada uno de los grupos inmunizados con la proteína recombinante adsorbida en hidróxido de aluminio y con la preparación control. Cada animal recibió una dosis de 100 DL₅₀ de DEN-1 letal por inoculación intracraneal y se observaron durante 21 días para obtener los porcentajes de letalidad en términos de muerte por encefalitis vírica. Como control positivo se utilizó un grupo de 10 ratones inmunizados con virus DEN-1 infeccioso (104 ufp). Todos los ratones del grupo de control positivo sobrevivieron, mientras que en el grupo de control negativo todos los ratones estaban enfermos sobre el día 7-11 tras el desafío y se obtuvo un 100% de mortalidad a día 21. Finalmente, el grupo inmunizado con la proteína recombinante PDC-1 presentó un 50% de protección (Tabla 11).

Tabla 11. Porcentaje de supervivencia en ratones inmunizados con las variantes proteicas ensayadas tras el desafío con virus homólogo DEN letal.

Inmunógeno	Porcentajes de supervivencia*
XL-1 Blue (Control -)	0
DEN-1 (Control +)	100
PDC-1	50

* Se calculó: (nº de supervivientes) / (nº total de ratones). Los datos de supervivientes se tomaron 21 días después del desafío.

EJEMPLO 17. Respuesta linfoproliferativa

El resto de los animales del grupo inmunizado con la proteína PDC-1 se sacrificaron 15 días después de la última dosis. Luego se extrajeron sus bazos y se estudió la respuesta linfoproliferativa al DEN-1. Los resultados de la tabla 12 muestran los índices de estimulación obtenidos.

Tabla 12. Índices de estimulación de los linfocitos de ratones inmunizados contra el serotipo homólogo.

	PDC-1 Hidróxido de aluminio
DEN-1 **	8*
Antígeno Control***	1,5
PHA****	7

* Índice de estimulación: Cociente medio de recuentos / minutos de las muestras entre recuentos / minutos de la síntesis espontánea de ADN control.
 ** Preparación de cerebros de ratones infectados con DEN-1.
 *** Preparación de cerebros de ratones no infectados
 **** Phytohemaglutinina Mitogen (Control Positivo),

EJEMPLO 18. Clonación y expresión de PDC-2 Dom III.

La secuencia de nucleótidos que codifica los aminoácidos 286 a 426 de la proteína de envoltura de DEN-2 (Secuencia N° 12), correspondiente a la región del dominio III de la proteína, se amplificó con los oligonucleótidos identificados en la lista de secuencias como Secuencia N° 13 y Secuencia N° 14 de la cepa de virus DEN-2 genotipo Jamaica (Deubel V., Kinney R.M., Trent D.W. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the nonstructural proteins of Dengue type 2 virus, Jamaica genotype: Comparative analysis of the full-length genome. Virology 1988.165:234-244).

Se creó el vector por digestión del plásmido pDC-2 con *BamHI/BamHI*, que contiene el promotor del fago T5, una cola histidina-6 en la región del extremo N y la región correspondiente a 100 aminoácidos de la proteína de cápside del virus DEN-2. Tras la unión, los recombinantes potenciales se analizaron por digestión por enzimas de restricción y los clones positivos se secuenciaron para comprobar las uniones. Finalmente el clon seleccionado se llamó pDC-3 Dom III (Secuencia N° 15).

Las células XL-1 Blue competentes (Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166:557-580) se transformaron con el clon seleccionado llamado pDC-2 Dom III. Las cepas de *E. coli* transformadas se cultivaron en LB suplementado con Ampicilina a 50 µg/ml durante 10 h a 37 °C. Se utilizó isopropil-B-D-tiogalactopiranosido (IPTG) hasta una concentración final de 1 mM para la inducción del promotor. Tras el crecimiento de la colonia, se realizó un SDS-PAGE del lisado celular. Como resultado se obtuvo una banda a 30-kDa. Se reconoció la proteína por un HMAF anti-DEN-2. Esta proteína se denominó PDC-2 Dom III (Secuencia N° 16).

EJEMPLO 19. Semipurificación y caracterización de PDC-2 Dom III.

La biomasa obtenida de la cepa de *E. coli* transformada con pDC-2 y cultivada a 37 °C se destruyó con una prensa de French. La proteína recombinante se obtuvo distribuida por igual entre las fracciones soluble e insoluble. Se hizo una cromatografía de intercambio aniónico de la fracción soluble, utilizando una columna de *Q sepharosa FF* y el tampón Tris 10 mM a pH 8. La proteína de la fracción no adsorbida se obtuvo con un 40% de pureza, y se utilizó para los estudios inmunológicos (Fig. 2).

EJEMPLO 20. Evaluación inmunológica de la PDC-2 Dom III semipurificada en ratones.

Se utilizaron cinco grupos de ratones. Uno de los grupos se inmunizó con 10 ug de proteína recombinante por vía intraperitoneal, utilizando hidróxido de aluminio como adyuvante. La fracción soluble que resultó de la ruptura de las células *XL-1 Blue* transformadas con el plásmido pQE-30 se utilizó como control negativo, y con hidróxido de aluminio como adyuvante. Otros dos grupos se incluyeron como controles. Uno de ellos se inmunizó con la proteína PDC-2 y el otro con la proteína PD5 (esta proteína contiene la región del dominio III de la proteína de envoltura del virus DEN-2). Se extrajo la sangre de diez animales de cada grupo 15 días después de la tercera dosis y se determinaron los títulos de anticuerpos contra DEN-2 por ELISA. Como se muestra en las Tablas 13 y 14, el grupo inmunizado con PDC-2 Dom III desarrolló títulos altos de anticuerpos específicos del serotipo contra DEN-2, más altos que los inducidos por la proteína PD5. Estos resultados demuestran que la combinación genética con la proteína de cápside aumenta la respuesta inmunitaria antiviral producida por el dominio III de la proteína de envoltura.

Tabla 13. Títulos de anticuerpos contra virus DEN-2 en sueros obtenidos después de la inmunización con la proteína de cápside-Dom III

Ratón	Grupos inmunizados con:			
	PDC-2	PDC-2 Dom III	PD5	P64k
1	< 1:100	< 1:320000	< 1:32000	< 1:100
2	< 1:100	< 1:640000	< 1:32000	< 1:100
3	< 1:100	< 1:640000	< 1:64000	< 1:100
4	< 1:100	< 1:640000	< 1:64000	< 1:100
5	< 1:104	< 1:128000	< 1:64000	< 1:100
6	< 1:100	< 1:320000	< 1:32000	< 1:100
7	< 1:100	< 1:128000	< 1:64000	< 1:100
8	< 1:100	< 1:64000	< 1:128000	< 1:100
9	< 1:000	< 1:64000	< 1:32000	< 1:100
10	< 1:100	< 1:128000	< 1:64000	< 1:100

Tabla 14. Determinación de la especificidad de serotipo de los anticuerpos contenidos en las mezclas de los sueros obtenidos de cada grupo

Antígeno Vírico	Grupos inoculados con:			
	PDC-2	PDC-2 Dom III	PD5	P64k
DEN-1	< 1:100	< 1:200	< 1:200	< 1:100
DEN-2	< 1:100	< 1:320 000	< 1:64 000	< 1:100
DEN-3	< 1:100	< 1:200	< 1:200	< 1:100
DEN-4	< 1:100	< 1:200	< 1:200	< 1:100

Por otra parte, se tomaron de cada grupo 10 animales adicionales para los ensayos de linfoproliferación. Se extrajeron las células de los bazo de estos animales y se estimularon con el virus DEN-2 infeccioso. La tabla 15 muestra que en el grupo inmunizado con la combinación, los índices de estimulación eran mayores que en los del grupo inmunizado solo con la proteína de cápside. Los índices de estimulación en el grupo inmunizado con proteína PD5 fueron los más bajos.

Tabla 15. Índices de estimulación de los linfocitos de ratones inmunizados contra el serotipo homólogo.

	PDC-2	PDC-2 / PD5	PD5	P64k
DEN-2 **	9,5*	11,6	2,2	1,2
Antígeno*** Control (-)	1,2	1,1	1,2	1,6
PHA****	7,6	7,4	7,5	7,9
<p>* Índice de estimulación: Cociente medio de recuentos / minutos de las muestras entre recuentos / minutos de la síntesis de ADN espontánea control.</p> <p>** Preparación de cerebros de ratones infectados con DEN-2.</p> <p>*** Preparación de cerebros de ratones no infectados</p> <p>**** Phytohemaglutinina Mitogen (Control Positivo),</p>				

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Center for Gentic Engineering and Biotechnology

5 <120> Proteína de la cápside del virus del Dengue que induce una respuesta protectora y su composición farmacéutica

<130> Dengue

10 <160> 24

<170> PatentIn versión 3.2

15 <210> 1
<211> 24
<212> ADN
<213> Virus del Dengue

20 <220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(24)
<223> Secuencia del oligonucleótido BamH-I para la amplificación de la proteína de la cápside del virus del Dengue 2

25 <400> 1
cgggatccaa taaccaacga aaaa 24

30 <210> 2
<211> 23
<212> ADN
<213> Virus del Dengue

35 <220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(23)
<223> Secuencia del oligonucleótido Hind-III para la amplificación de la proteína de la cápside del virus DEN-2

40 <400> 2
acaagctttt acctgctct cct 23

45 <210> 3
<211> 339
<212> ADN
<213> Virus del Dengue

50 <220>
<221> gen
<222> (1)..(339)
<223> Secuencia de nucleótidos que codifica los aminoácidos 1 a 113 de la proteína de la cápside del virus del Dengue 2

<400> 3

aataaccaac gaaaaaaggc gagaagtacg ccttcaata tgctgaaacg cgagagaaac 60
cgcgtgtcaa ctgtgcaaca gctgacaaag agattctcac ttggaatgct gcaaggacga 120
ggaccattaa aactgttcat ggccttctg gcgttccttc gtttctaac aatcccacca 180
acagcagggga tactgaaaag atggggaacg atcaaaaaat caaaagctat caatgtttg 240
agaggggtca ggaaagagat tgaaggatg ctgaacatct tgaacaggag acgcaggaca 300
gcaggcgtga ttattatgtt gattccaaca gcgatggcg 339

5 <210> 4
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Virus del Dengue

10 <220>
 <221> gen
 <222> (1)..(339)
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica PDC-2 en el plásmido pQE-30

<400> 4

atgagaggat cgcatcacca tcacatcac ggatccaata accaacgaaa aaaggcgaga 60
agtagccctt tcaatatgct gaaacgag agaaaccgag tgtaactgt gcaacagctg 120
acaagagat tctcactgg aatgtgcaa ggacgaggac cattaanaact gttcatggcc 180
ctgtggcgt tcttctgtt ctaacaatc ccaccaacag cagggatact gaaaagatgg 240
ggaacgatca aaaaatcaaa agctatcaat gtttgagag gggtcaggaa agagattgga 300
aggatgctga acatctttaa caggagacgc taaaagctt 339

15 <210> 5
 <211> 111
 <212> PRT
 20 <213> Virus del Dengue

<220>
 <221> CADENA
 <222> (1)..(111)
 25 <223> Secuencia de aminoácidos correspondiente a la proteína PCD-2

<400> 5

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Ser Asn Asn Gln Arg
1 5 10 15

Lys Lys Ala Arg Ser Thr Pro Phe Asn Met Leu Lys Arg Glu Arg Asn
20 25 30

Arg Val Ser Thr Val Gln Gln Leu Thr Lys Arg Phe Ser Leu Gly Met
35 40 45

Leu Gln Gly Arg Gly Pro Leu Lys Leu Phe Met Ala Leu Val Ala Phe
50 55 60

Leu Arg Phe Leu Thr Ile Pro Pro Thr Ala Gly Ile Leu Lys Arg Trp
65 70 75 80

Gly Thr Ile Lys Lys Ser Lys Ala Ile Asn Val Leu Arg Gly Phe Arg
85 90 95

Lys Glu Ile Gly Arg Met Leu Asn Ile Leu Asn Arg Arg Arg Arg
100 105 110

<210> 6
<211> 3461
<212> ADN
<213> Artificial

5

<220>
<223> plásmido pQE-30

10

<220>
<221> misc_feature
<223> Secuencia de nucleótidos del plásmido pQE-30. Los sitios de restricción BamHI/Hind III están destacados en cursiva.

15

<400> 6

ctcgagaaat cataaaaaat ttatttgctt tgtgagcgga taacaattat aatagattca 60
attgtgagcg gataacaatt tcacacagaa tcattaaag aggagaaatt aactatgaga 120
ggatcgcatc accatcacca tcacggatcc gcatgagagc togtacccc gggtcgacct 180
gcagccaagc ttaattagct gagcttggac tctgttgat agatccagta atgacctag 240
aactccatct ggatttgtc agaacgctcg gttgccgccg ggcgttttt attggtgaga 300
atccaagcta gcttggcgag atttcagga gctaaggaag ctaaaatgga gaaaaaatc 360
actggatata ccacgltga tatarccaa tggcatcgta aagaacattt tgaggcatt 420
cagtcagttg ctcaatgtac ctataaccag accgttcagc tggatattac ggcctttta 480
aagaccgtaa agaaaaataa gcacaagttt tatccggcct ttattcacat tctgcccgc 540
ctgatgaatg ctcacccgga atttcgtatg gcaatgaaag accgtgagct ggtgatatgg 600
gatagtgtc accctgtta caccgtttc catgagcaaa ctgaaacgtt ttcacgctc 660
tggagtgaat accacgacga ttccggcag ttctacaca tatattcgca agatgtggcg 720

tgttacggtg aaaacctggc ctatttcctt aaagggttta ttgagaatat gtttttcgtc 780
 tcagccaatc cctgggtgag ttcaccagt ttgatftaa acgtggccaa tatggacaac 840
 ttcttggccc cgtttcacc atgggcaaat attatacga aggcgacaag gtgctgatgc 900
 cgctggcgat tcaggftcat catgccgtct gtgatggctt ccatgtcggc agaatgctta 960
 atgaattaca acagtactgc gatgagtggc agggcggggc gtaattttt taaggcagtt 1020
 attggtgccc ttaaaccgct ggggtaatga ctctctagct tgaggcatca aataaaacga 1080
 aaggctcagt cgaagactg ggcctttcgt tttatctgtt gtttgcggt gaacgctctc 1140
 ctgaglagga caaatccgcc gctctagagc tgcctcgcgc gtttcgggta tgacggtgaa 1200
 aacctctgac acatgcagct cccggagacg gtcacagctt gtctgtaagc ggatgccggg 1260
 agcagacaag cccgtcaggg cgcgtcagcg ggtgtggcg ggtgtgggg cgcagccatg 1320
 acccagtcac gtagcgatag cggagtgtat actggctaa ctatcgggca tcagagcaga 1380
 ttgtactgag agtgcacat atgcgggtg aaataccgca cagatcgtta aggagaaaat 1440
 accgcatcag gcgctctcc gcttctcgc tcactgactc gctgcgctcg gtcctcggc 1500
 tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaagg cgtaatacg gttatccaca gaatcagggg 1560
 ataaccgagg aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg 1620
 ccgctgtctt ggcgttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcagc 1680
 gctcaagtca gaggtggcga aaccggacag gactataaag ataccaggcg ttccccctg 1740
 gaagctccct cgtgcgctt cctgttccga cctgcccgt tacgggatac ctgtccgct 1800
 ttctccctc gggaagcgtg gcgcttctc aatgctcaog ctgtaggtat ctcagttcgg 1860
 tgtaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct 1920
 gcgcttate cggtaaclat cgtctgagt ccaaccgggt aagacacgac ttatgccac 1980
 tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcgaggta ttagggcggg gctacagagt 2040
 tctgaagtg gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttgg atctgcgctc 2100
 tgctgaagcc agttaccctc ggaaaaagag ttgtagctc ttgatccggc aaacaaacca 2160
 ccgctgtag cggtggtttt ttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaggat 2220
 ctcaagaaga tcctttgatc tttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac 2280
 gtttaaggat ttgggtcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaatt 2340
 aaaaatgaag ttttaaatca atctaaagta tatatgagta aacttggct gacagttacc 2400
 aatgctaat cagtgaggca cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagctg 2460

cctgactccc cgtcgtgtag ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagt 2520
 ctgcaatgat accgcgagac ccacgctcac cggctccaga ttatcagca ataaaccagc 2580
 cagccggaag ggccgagcgc agaagtggtc ctgcaacttt atcgcctcc atccagtcta 2640
 ttaattgtg ccggaagct agagtaagta gttgccagt taatagttg cgcaacgtg 2700
 ttgccattgc tacaggcatc gtgggtcac gctcgtcgtt tggatggct tcattcagct 2760
 ccggttcca acgatcaagg cgagttacat gatccccat gttgtgcaaa aaagcggta 2820
 gctcctcgg tcctccgac gtgtcagaa gtaagttggc cgcagtgta tcactcatgg 2880
 ttatggcagc actgcataat tctctactg tcatgccatc cgtaagatgc tttctgtga 2940
 ctggtgagta ctcaaccaag tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt 3000
 gcccgcgctc aatacgggat aataccgcgc cacatagcag aacttaaaa gtgctcatca 3060
 ttgaaaacg ttctcgggg cgaaaactct caaggatctt accgctgtg agatccagtt 3120
 cgatgtaacc cactcgtgca cccaactgat cttcagcatc tttacttc accagcgttt 3180
 ctgggtgagc aaaaacagga aggcaaatg ccgcaaaaaa ggaataagg gcgacacgga 3240
 aatgtgaat actcactc ttcttttc aatattatg aagcattat cagggttatt 3300
 gtctcatgag cggatacata ttgaaatgta tttagaaaaa taaacaaata ggggttccgc 3360
 gcacatttc ccgaaaagtg ccacctgacg tctaagaaac cattattatc atgacattaa 3420
 cctataaaaa taggcgtatc acgaggccct ttcgtcttca c 3461

- 5 <210> 7
- <211> 300
- <212> ADN
- <213> Virus del Dengue
- 10 <220>
- <221> gen
- <222> (1)..(300)
- <223> Secuencia de nucleótidos que codifica los aminoácidos 1 a 100 de la proteína de la cápside del virus del Dengue 1
- 15 <400> 7

ES 2 444 691 T3

atgaacaacc aacggaaaaa gacggctcga ccgtcttca atatgctgaa acgcgcgaga 60
aacgcggtgt caactgttc acagtggcg aagagattct caaaaggatt gctctcaggc 120
caaggacca tgaaattggt gatggccttc atagcattcc taagatttct agccataccc 180
ccaacagcag gaatttggc tagatggggc tcatcaaga agaatggagc gatcaaagtg 240
ctacggggtt tcaagaaaga aatctcaaac atgtgaata taatgaatag aaggaaaaga 300

5 <210> 8
<211> 26
<212> ADN
<213> Virus del Dengue

10 <220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(26)
<223> Secuencia del oligonucleótido BamH-I para la amplificación de la proteína de la cápside del virus DEN-1.

15 <400> 8
ggatccatga acaaccaacg gaaaaa 26

20 <210> 9
<211> 24
<212> ADN
<213> Virus del Dengue

25 <220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(24)
<223> Secuencia del oligonucleótido Hind-III para la amplificación de la proteína de la cápside del virus DEN-1

30 <400> 9
aagcttctt ttccttctat tcat 24

35 <210> 10
<211> 345
<212> ADN
<213> Virus del Dengue

40 <220>
<221> gen
<222> (1)..(345)
<223> Secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica PDC-1 en el plásmido pQE-30

<400> 10

atgagaggat cgcacacca tcacatcac ggatccatga acaaccaacg gaaaaagacg 60
 gctcgaccgt cttcaatat gctgaaacgc gcgagaaacc gcggtcaac tgttcacag 120
 ttggcgaaga gattctcaaa aggattgctc tcaggccaag gacccatgaa attgggatg 180
 gccttcatag cattoctaag attctagcc atacccccaa cagcaggaat ttggctaga 240
 tggggctcat tcaagaagaa tggagcgcgc aaagtgcctac ggggttcaa gaaagaaatc 300
 tcaaactgt tgaatataat gaatagaagg aaaagataaa agctt 345

5 <210> 11
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Virus del Dengue

10 <220>
 <221> CADENA
 <222> (1)..(112)
 <223> Secuencia de aminoácidos que corresponde a la proteína PDC-1

<400> 11

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Ser Met Asn Asn Gln
 1 5 10 15
 Arg Lys Lys Thr Ala Arg Pro Ser Phe Asn Met Leu Lys Arg Ala Arg
 20 25 30
 Asn Arg Val Ser Thr Val Ser Gln Leu Ala Lys Arg Phe Ser Lys Gly
 35 40 45
 Leu Leu Ser Gly Gln Gly Pro Met Lys Leu Val Met Ala Phe Ile Ala
 50 55 60
 Phe Leu Arg Phe Leu Ala Ile Pro Pro Thr Ala Gly Ile Leu Ala Arg
 65 70 75 80
 Trp Gly Ser Phe Lys Lys Asn Gly Ala Ile Lys Val Leu Arg Gly Phe
 85 90 95
 Lys Lys Glu Ile Ser Asn Met Leu Asn Ile Met Asn Arg Arg Lys Arg
 100 105 110

15 <210> 12
 <211> 426
 <212> ADN
 20 <213> Virus del Dengue

<220>
 <221> gen
 <222> (1)..(426)
 25 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica DomB de la proteína de la envuelta del virus DEN-2

<400> 12

aggctgagaa tggacaaact acagctcaaa ggaatgcat actctatgtg tacaggaaag 60

tttaaaattg tgaaggaaat agcagaaaca caacatggaa caatagttat cagagtacaa 120

tatgaagggg acggctctcc atgtaagatc cctttgaga taatggattt ggaaaaaaga 180

cacgtcttag gtcgcctgat tacagttaac ccgatcgtaa cagaaaaaga tagcccagtc 240

aacatagaag cagaacctcc attcggagac agctacatca tcataggagt agagccggga 300

caattgaaac tcaactgggt taagaaagga agttccatcg gccaaatgtt tgagacaaca 360

atgagaggag cgaagagaat ggccatttta ggtgacacag cctgggattt tgaagcctg 420

ggagggg

426

- 5 <210> 13
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Virus del Dengue
- 10 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(21)
 <223> Secuencia del oligonucleótido 5' para la amplificación de la región que codifica los aminoácidos 286 a 426 de la proteína de la envuelta del virus DEN-2
- 15 <400> 13
 cttggatcca ttctgagaat g 21
- 20 <210> 14
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Virus del Dengue
- 25 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(33)
 <223> Secuencia del oligonucleótido 3' para la amplificación de la región que codifica los aminoácidos 286 a 426 de la proteína de la envuelta del virus DEN-2
- 30 <400> 14
 tgtggatcct cctcctaggc ttccaaaatc cca 33
- 35 <210> 15
 <211> 753
 <212> ADN
 <213> Virus del Dengue
- 40 <220>
 <221> gen
 <222> (1)..(753)
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica pDC-2 DomIII
 <400> 15

catcaccatc accatcacgg atccaggctg agaatggaca aactacagct caaaggaatg 60
 tcatactcta tgtgtacagg aaagttaaa attgtgaagg aaatagcaga aacacaacat 120
 ggaacaatag ttatcagagt acaatatgaa ggggacggct ctccatgtaa gatccctttt 180
 gagataatgg atttgaaaa aagacaagtc ttaggtcgcc tgattacagt taaccgcatc 240
 gtaacagaaa aagatagccc agtcaacata gaagcagaac ctccattcgg agacagctac 300
 atcatcatag gagtagagcc gggacaattg aaactcaact ggттааgaa aggaagtcc 360
 atcggccaaa tgttgagac acaatgaga ggagcgaaga gaatggccat ttaggtgac 420
 acagcctggg atttggatc cctgggagga ggatccaata accaacgaaa aaaggcgaga 480
 agtacgccit tcaatatgct gaaacgcgag agaaaccgcg tgtcaactgt gcaacagctg 540
 acaaagagat tctcactgg aatgctgcaa ggacgaggac cattaanaact gtcatggcc 600
 ctgtggcgt tcctcgttt cctaacaatc ccaccaacag cagggatact gaaaagatgg 660
 ggaacgatca aaaaatcaaa agctatcaat gtttgagag gggtcaggaa agagattgga 720
 aggatgctga acatctgaa caggagacgc taa 753

5

<210> 16
 <211> 250
 <212> PRT
 <213> Virus del Dengue

10

<220>
 <221> CADENA
 <222> (1)..(250)
 <223> Secuencia de aminoácidos de PDC-2 Dom III
 <400> 16

His His His His His His Gly Ser Arg Leu Arg Met Asp Lys Leu Gln
 1 5 10 15
 Leu Lys Gly Met Ser Tyr Ser Met Cys Thr Gly Lys Phe Lys Ile Val
 20 25 30
 Lys Glu Ile Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Ile Val Ile Arg Val Gln
 35 40 45
 Tyr Glu Gly Asp Gly Ser Pro Cys Lys Ile Pro Phe Glu Ile Met Asp
 50 55 60
 Leu Glu Lys Arg His Val Leu Gly Arg Leu Ile Thr Val Asn Pro Ile
 65 70 75 80
 Val Thr Glu Lys Asp Ser Pro Val Asn Ile Glu Ala Glu Pro Pro Phe
 85 90 95
 Gly Asp Ser Tyr Ile Ile Ile Gly Val Glu Pro Gly Gln Leu Lys Leu
 100 105 110
 Asn Trp Phe Lys Lys Gly Ser Ser Ile Gly Gln Met Phe Glu Thr Thr
 115 120 125
 Met Arg Gly Ala Lys Arg Met Ala Ile Leu Gly Asp Thr Ala Trp Asp
 130 135 140
 Phe Gly Ser Leu Gly Gly Gly Ser Asn Asn Gln Arg Lys Lys Ala Arg
 145 150 155 160
 Ser Thr Pro Phe Asn Met Leu Lys Arg Glu Arg Asn Arg Val Ser Thr
 165 170 175
 Val Gln Gln Leu Thr Lys Arg Phe Ser Leu Gly Met Leu Gln Gly Arg
 180 185 190
 Gly Pro Leu Lys Leu Phe Met Ala Leu Val Ala Phe Leu Arg Phe Leu
 195 200 205
 Thr Ile Pro Pro Thr Ala Gly Ile Leu Lys Arg Trp Gly Thr Ile Lys
 210 215 220
 Lys Ser Lys Ala Ile Asn Val Leu Arg Gly Phe Arg Lys Glu Ile Gly
 225 230 235 240
 Arg Met Leu Asn Ile Leu Asn Arg Arg Arg
 245 250

<210> 17
 <211> 142
 <212> PRT
 <213> Virus del Dengue de tipo 1

ES 2 444 691 T3

<220>
<221> CADENA
<222> (1)..(142)
<223> Secuencia de aminoácidos correspondiente a DomB de la proteína de la envuelta del virus DEN-1

5

<400> 17

Arg Leu Lys Met Asp Lys Leu Thr Leu Lys Gly Val Ser Tyr Val Met
1 5 10 15

Cys Thr Gly Ser Phe Lys Leu Glu Lys Glu Val Ala Glu Thr Gln His
20 25 30

Gly Thr Val Leu Val Gln Val Lys Tyr Glu Gly Thr Asp Ala Pro Cys
35 40 45

Lys Ile Pro Phe Ser Ser Gln Asp Glu Lys Gly Val Thr Gln Asn Gly
50 55 60

Arg Leu Ile Thr Ala Asn Pro Ile Val Ile Asp Lys Glu Lys Pro Val
65 70 75 80

Asn Ile Glu Ala Glu Pro Pro Phe Gly Glu Ser Tyr Ile Val Val Gly

85 90 95

Ala Gly Glu Lys Ala Leu Lys Leu Ser Trp Phe Lys Lys Gly Ser Ser
100 105 110

Ile Gly Lys Met Phe Glu Ala Thr Ala Arg Gly Ala Arg Arg Met Ala
115 120 125

Ile Leu Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Ile Gly Gly
130 135 140

10 <210> 18
<211> 142
<212> PRT
<213> Virus del Dengue de tipo 3

15 <220>
<221> CADENA
<222> (1)..(142)
<223> Secuencia de aminoácidos correspondiente a DomB de la proteína de la envuelta del virus DEN-3

20 <400> 18

Arg Leu Lys Met Asp Lys Leu Glu Leu Lys Gly Met Ser Tyr Ala Met
 1 5 10 15

Cys Thr Asn Thr Phe Val Leu Lys Lys Glu Val Ser Glu Thr Gln His
 20 25 30

Gly Thr Ile Leu Ile Lys Val Glu Tyr Lys Gly Glu Asp Val Pro Cys
 35 40 45

Lys Ile Pro Phe Ser Thr Glu Asp Gly Gln Gly Lys Ala His Asn Gly
 50 55 60

Arg Leu Ile Thr Ala Asn Pro Val Val Thr Lys Lys Glu Glu Pro Val
 65 70 75 80

Asn Ile Glu Ala Glu Pro Pro Phe Gly Glu Ser Asn Ile Val Ile Gly
 85 90 95

Ile Gly Asp Asn Ala Leu Lys Ile Asn Trp Tyr Lys Lys Gly Ser Ser
 100 105 110

Ile Gly Lys Met Phe Glu Ala Thr Ala Arg Gly Ala Arg Arg Met Ala
 115 120 125

Ile Leu Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Val Gly Gly
 130 135 140

<210> 19
 <211> 142
 <212> PRT
 <213> Virus del Dengue de tipo 4

5

<220>
 <221> CADENA
 <222> (1)..(142)
 <223> Secuencia de aminoácidos correspondiente a Dom B de la proteína de la envuelta del virus DEN-4

10

<400> 19

Lys Val Arg Met Glu Lys Leu Arg Ile Lys Gly Met Ser Tyr Thr Met
 1 5 10 15

Cys Ser Gly Lys Phe Ser Ile Asp Lys Glu Met Ala Glu Thr Gln His
 20 25 30

Gly Thr Thr Val Val Lys Val Lys Tyr Glu Gly Ala Gly Ala Pro Cys
 35 40 45

Lys Val Pro Ile Glu Ile Arg Asp Val Asn Lys Glu Lys Val Val Gly
 50 55 60

Arg Ile Ile Ser Ser Thr Pro Leu Ala Glu Asn Thr Asn Ser Val Thr
 65 70 75 80

Asn Ile Glu Leu Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Val Ile Gly
 85 90 95

Val Gly Asn Ser Ala Leu Thr Leu His Trp Phe Arg Lys Gly Ser Ser
 100 105 110

Ile Gly Lys Met Phe Glu Ser Thr Tyr Arg Gly Ala Lys Arg Met Ala
 115 120 125

Ile Leu Gly Glu Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Val Gly Gly
 130 135 140

<210> 20
 <211> 749
 <212> PRT
 <213> Virus del Dengue de tipo 1

5

<220>
 <221> CADENA
 <222> (1)..(749)
 <223> Secuencia de aminoácidos que corresponde a la proteína PLH3.

10

<400> 20

Met Gly His His His His His His Ala Met Val Asp Lys Arg Met Ala
 1 5 10 15

Leu Val Glu Leu Lys Val Pro Asp Ile Gly Gly His Glu Asn Val Asp
 20 25 30

15

Ile Ile Ala Val Glu Val Asn Val Gly Asp Thr Ile Ala Val Asp Asp
 35 40 45

Thr Leu Ile Thr Leu Asp Leu Glu Met Asp Val Pro Ala Glu Val Ala
 50 55 60

Gly Val Val Lys Glu Val Lys Val Lys Val Gly Asp Lys Ile Ser Glu
 65 70 75 80

Gly Gly Leu Ile Val Val Val Glu Ala Glu Gly Thr Ala Ala Ala Pro
 85 90 95

Lys Ala Glu Ala Ala Ala Ala Pro Ala Gln Glu Ala Pro Lys Ala Ala
 100 105 110

Ala Pro Ala Pro Gln Ala Ala Gln Phe Gly Gly Ser Ala Asp Ala Glu
 115 120 125

Tyr Asp Val Val Val Leu Gly Gly Gly Pro Gly Gly Tyr Ser Ala Ala
 130 135 140

Phe Ala Ala Ala Asp Glu Gly Leu Lys Val Ala Ile Val Glu Arg Tyr
 145 150 155 160

Lys Thr Leu Gly Gly Val Cys Leu Asn Val Gly Cys Ile Pro Ser Lys
 165 170 175

Ala Leu Leu His Asn Ala Ala Val Ile Asp Glu Val Arg His Leu Ala
 180 185 190

Ala Asn Gly Ile Lys Tyr Pro Glu Pro Glu Leu Asp Ile Asp Met Leu
 195 200 205

Arg Ala Tyr Lys Asp Gly Val Val Ser Arg Leu Thr Gly Gly Leu Ala
 210 215 220

Gly Met Ala Lys Ser Arg Lys Val Asp Val Ile Gln Gly Asp Gly Gln
 225 230 235 240

Phe Leu Asp Pro His His Leu Glu Val Ser Leu Thr Ala Gly Asp Ala
 245 250 255

Tyr Glu Gln Ala Ala Pro Thr Gly Glu Lys Lys Ile Val Ala Phe Lys
 260 265 270

Asn Cys Ile Ile Ala Ala Gly Ser Arg Val Thr Lys Leu Pro Phe Ile
 275 280 285

Pro Glu Asp Pro Arg Ile Ile Asp Ser Ser Gly Ala Leu Ala Leu Lys
 290 295 300

Glu Val Pro Gly Lys Leu Leu Ile Ile Gly Gly Gly Ile Ile Gly Leu
 305 310 315 320

Glu Met Gly Thr Val Tyr Ser Thr Leu Gly Ser Arg Leu Asp Val Val
 325 330 335

Glu Met Met Asp Gly Leu Met Gln Gly Ala Asp Arg Asp Leu Val Lys

340 345 350
 Val Trp Gln Lys Gln Asn Glu Tyr Arg Phe Asp Asn Ile Met Val Asn
 355 360 365
 Thr Lys Thr Val Ala Val Glu Pro Lys Glu Asp Gly Val Tyr Val Thr
 370 375 380
 Phe Glu Gly Ala Asn Ala Pro Lys Glu Pro Gln Arg Tyr Asp Ala Val
 385 390 395 400
 Leu Val Ala Ala Gly Arg Ala Pro Asn Gly Lys Leu Ile Ser Ala Glu
 405 410 415
 Lys Ala Gly Val Ala Val Thr Asp Arg Gly Phe Ile Glu Val Asp Lys
 420 425 430
 Gln Met Arg Thr Asn Val Pro His Ile Tyr Ala Ile Gly Asp Ile Val
 435 440 445
 Gly Gln Pro Met Leu Ala His Lys Ala Val His Glu Gly His Val Ala
 450 455 460
 Ala Glu Asn Cys Ala Gly His Lys Ala Tyr Phe Asp Ala Arg Val Ile
 465 470 475 480
 Pro Gly Val Ala Tyr Thr Ser Pro Glu Val Ala Trp Val Gly Glu Thr
 485 490 495
 Glu Leu Ser Ala Lys Ala Ser Gly Arg Lys Ile Thr Lys Ala Asn Phe
 500 505 510
 Pro Trp Ala Ala Ser Gly Arg Ala Ile Ala Asn Gly Cys Asp Lys Pro
 515 520 525
 Phe Thr Lys Leu Ile Phe Asp Ala Glu Thr Gly Arg Ile Ile Gly Gly
 530 535 540
 Gly Ile Val Gly Pro Asn Gly Gly Asp Met Ile Gly Glu Val Cys Leu
 545 550 555 560
 Ala Ile Glu Met Gly Cys Asp Ala Ala Asp Ile Gly Lys Thr Ile His
 565 570 575
 Pro His Pro Thr Leu Gly Glu Ser Ile Gly Met Ala Ala Glu Val Ala
 580 585 590
 Leu Gly Thr Cys Thr Asp Leu Pro Pro Gln Lys Lys Lys Gly Ser Arg
 595 600 605
 Leu Lys Met Asp Lys Leu Thr Leu Lys Gly Val Ser Tyr Val Met Cys
 610 615 620
 Thr Gly Ser Phe Lys Leu Glu Lys Glu Val Ala Glu Thr Gln His Gly
 625 630 635 640
 Thr Val Leu Val Gln Val Lys Tyr Glu Gly Thr Asp Ala Pro Cys Lys
 645 650 655

Ile Pro Phe Ser Ser Gln Asp Glu Lys Gly Val Thr Gln Asn Gly Arg
660 665 670

Leu Ile Thr Ala Asn Pro Ile Val Ile Asp Lys Glu Lys Pro Val Asn
675 680 685

Ile Glu Ala Glu Pro Pro Phe Gly Glu Ser Tyr Ile Val Val Gly Ala
690 695 700

Gly Glu Lys Ala Leu Lys Leu Ser Trp Phe Lys Lys Gly Ser Ser Ile
705 710 715 720

Gly Lys Met Phe Glu Ala Thr Ala Arg Gly Ala Arg Arg Met Ala Ile
725 730 735

Leu Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Ile Gly Gly
740 745

<210> 21
<211> 749
5 <212> PRT
<213> Virus del Dengue de tipo 3

<220>
10 <221> CADENA
<222> (1)..(749)
<223> Secuencia de aminoácidos que corresponde a la proteína PAZ3.

<400> 21

Met Gly His His His His His His Ala Met Val Asp Lys Arg Met Ala
1 5 10 15

Leu Val Glu Leu Lys Val Pro Asp Ile Gly Gly His Glu Asn Val Asp
 20 25 30

Ile Ile Ala Val Glu Val Asn Val Gly Asp Thr Ile Ala Val Asp Asp
 35 40 45

Thr Leu Ile Thr Leu Asp Leu Glu Met Asp Val Pro Ala Glu Val Ala
 50 55 60

Gly Val Val Lys Glu Val Lys Val Lys Val Gly Asp Lys Ile Ser Glu
65 70 75 80

Gly Gly Leu Ile Val Val Val Glu Ala Glu Gly Thr Ala Ala Ala Pro
 85 90 95

Lys Ala Glu Ala Ala Ala Ala Pro Ala Gln Glu Ala Pro Lys Ala Ala
 100 105 110

Ala Pro Ala Pro Gln Ala Ala Gln Phe Gly Gly Ser Ala Asp Ala Glu
 115 120 125

Tyr Asp Val Val Val Leu Gly Gly Gly Pro Gly Gly Tyr Ser Ala Ala
 130 135 140

Phe Ala Ala Ala Asp Glu Gly Leu Lys Val Ala Ile Val Glu Arg Tyr
 145 150 155 160

Lys Thr Leu Gly Gly Val Cys Leu Asn Val Gly Cys Ile Pro Ser Lys
 165 170 175

Ala Leu Leu His Asn Ala Ala Val Ile Asp Glu Val Arg His Leu Ala
 180 185 190

Ala Asn Gly Ile Lys Tyr Pro Glu Pro Glu Leu Asp Ile Asp Met Leu
 195 200 205

Arg Ala Tyr Lys Asp Gly Val Val Ser Arg Leu Thr Gly Gly Leu Ala
 210 215 220

Gly Met Ala Lys Ser Arg Lys Val Asp Val Ile Gln Gly Asp Gly Gln
 225 230 235 240

Phe Leu Asp Pro His His Leu Glu Val Ser Leu Thr Ala Gly Asp Ala
 245 250 255

Tyr Glu Gln Ala Ala Pro Thr Gly Glu Lys Lys Ile Val Ala Phe Lys
 260 265 270

Asn Cys Ile Ile Ala Ala Gly Ser Arg Val Thr Lys Leu Pro Phe Ile
 275 280 285

Pro Glu Asp Pro Arg Ile Ile Asp Ser Ser Gly Ala Leu Ala Leu Lys
 290 295 300

Glu Val Pro Gly Lys Leu Leu Ile Ile Gly Gly Gly Ile Ile Gly Leu
 305 310 315 320

Glu Met Gly Thr Val Tyr Ser Thr Leu Gly Ser Arg Leu Asp Val Val
 325 330 335

Glu Met Met Asp Gly Leu Met Gln Gly Ala Asp Arg Asp Leu Val Lys
 340 345 350

Val Trp Gln Lys Gln Asn Glu Tyr Arg Phe Asp Asn Ile Met Val Asn
 355 360 365

Thr Lys Thr Val Ala Val Glu Pro Lys Glu Asp Gly Val Tyr Val Thr
 370 375 380

Phe Glu Gly Ala Asn Ala Pro Lys Glu Pro Gln Arg Tyr Asp Ala Val
 385 390 395 400

Leu Val Ala Ala Gly Arg Ala Pro Asn Gly Lys Leu Ile Ser Ala Glu
 405 410 415

Lys Ala Gly Val Ala Val Thr Asp Arg Gly Phe Ile Glu Val Asp Lys
 420 425 430

Gln Met Arg Thr Asn Val Pro His Ile Tyr Ala Ile Gly Asp Ile Val
 435 440 445

Gly Gln Pro Met Leu Ala His Lys Ala Val His Glu Gly His Val Ala
 450 455 460

Ala Glu Asn Cys Ala Gly His Lys Ala Tyr Phe Asp Ala Arg Val Ile
 465 470 475 480

Pro Gly Val Ala Tyr Thr Ser Pro Glu Val Ala Trp Val Gly Glu Thr
 485 490 495

Glu Leu Ser Ala Lys Ala Ser Gly Arg Lys Ile Thr Lys Ala Asn Phe
 500 505 510

Pro Trp Ala Ala Ser Gly Arg Ala Ile Ala Asn Gly Cys Asp Lys Pro
 515 520 525

Phe Thr Lys Leu Ile Phe Asp Ala Glu Thr Gly Arg Ile Ile Gly Gly
 530 535 540

Gly Ile Val Gly Pro Asn Gly Gly Asp Met Ile Gly Glu Val Cys Leu
 545 550 555 560

Ala Ile Glu Met Gly Cys Asp Ala Ala Asp Ile Gly Lys Thr Ile His
 565 570 575

Pro His Pro Thr Leu Gly Glu Ser Ile Gly Met Ala Ala Glu Val Ala
 580 585 590

Leu Gly Thr Cys Thr Asp Leu Pro Pro Gln Lys Lys Lys Gly Ser Arg
 595 600 605

Leu Lys Met Asp Lys Leu Lys Leu Lys Gly Met Ser Tyr Ala Met Cys
 610 615 620

Leu Asn Thr Phe Val Leu Lys Lys Glu Val Ser Glu Thr Gln His Gly
 625 630 635 640

Thr Ile Leu Ile Lys Val Glu Tyr Lys Gly Glu Asp Ala Pro Cys Lys
 645 650 655

Ile Pro Phe Ser Thr Glu Asp Gly Gln Gly Lys Ala His Asn Gly Arg
 660 665 670

Leu Ile Thr Ala Asn Pro Val Val Thr Lys Lys Glu Glu Pro Val Asn
 675 680 685

Ile Glu Ala Glu Pro Pro Phe Gly Glu Ser Asn Ile Val Ile Gly Ile
 690 695 700

Gly Asp Lys Ala Leu Lys Ile Asn Trp Tyr Arg Lys Gly Ser Ser Ile
 705 710 715 720

Gly Lys Met Phe Glu Ala Thr Ala Arg Gly Ala Arg Arg Met Ala Ile
 725 730 735

Leu Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Val Gly Gly
 740 745

<210> 22
 <211> 749
 <212> PRT
 <213> Virus del Dengue de tipo 4

5

<220>
 <221> CADENA
 <222> (1)..(749)
 <223> Secuencia de aminoácidos que corresponde a PID3.

10

<400> 22

Met Gly His His His His His His Ala Met Val Asp Lys Arg Met Ala
 1 5 10 15

Leu Val Glu Leu Lys Val Pro Asp Ile Gly Gly His Glu Asn Val Asp
 20 25 30

Ile Ile Ala Val Glu Val Asn Val Gly Asp Thr Ile Ala Val Asp Asp
 35 40 45

Thr Leu Ile Thr Leu Asp Leu Glu Met Asp Val Pro Ala Glu Val Ala
 50 55 60

Gly Val Val Lys Glu Val Lys Val Lys Val Gly Asp Lys Ile Ser Glu
 65 70 75 80

Gly Gly Leu Ile Val Val Val Glu Ala Glu Gly Thr Ala Ala Ala Pro
 85 90 95

Lys Ala Glu Ala Ala Ala Ala Pro Ala Gln Glu Ala Pro Lys Ala Ala
 100 105 110

Ala Pro Ala Pro Gln Ala Ala Gln Phe Gly Gly Ser Ala Asp Ala Glu
 115 120 125

Tyr Asp Val Val Val Leu Gly Gly Gly Pro Gly Gly Tyr Ser Ala Ala
 130 135 140

Phe Ala Ala Ala Asp Glu Gly Leu Lys Val Ala Ile Val Glu Arg Tyr
 145 150 155 160

Lys Thr Leu Gly Gly Val Cys Leu Asn Val Gly Cys Ile Pro Ser Lys
 165 170 175

Ala Leu Leu His Asn Ala Ala Val Ile Asp Glu Val Arg His Leu Ala
 180 185 190

Ala Asn Gly Ile Lys Tyr Pro Glu Pro Glu Leu Asp Ile Asp Met Leu
 195 200 205

Arg Ala Tyr Lys Asp Gly Val Val Ser Arg Leu Thr Gly Gly Leu Ala
 210 215 220

Gly Met Ala Lys Ser Arg Lys Val Asp Val Ile Gln Gly Asp Gly Gln
 225 230 235 240

Phe Leu Asp Pro His His Leu Glu Val Ser Leu Thr Ala Gly Asp Ala
 245 250 255

Tyr Glu Gln Ala Ala Pro Thr Gly Glu Lys Lys Ile Val Ala Phe Lys
 260 265 270

Asn Cys Ile Ile Ala Ala Gly Ser Arg Val Thr Lys Leu Pro Phe Ile
 275 280 285

Pro Glu Asp Pro Arg Ile Ile Asp Ser Ser Gly Ala Leu Ala Leu Lys
 290 295 300

Glu Val Pro Gly Lys Leu Leu Ile Ile Gly Gly Gly Ile Ile Gly Leu
 305 310 315 320

Glu Met Gly Thr Val Tyr Ser Thr Leu Gly Ser Arg Leu Asp Val Val
 325 330 335

Glu Met Met Asp Gly Leu Met Gln Gly Ala Asp Arg Asp Leu Val Lys
 340 345 350

Val Trp Gln Lys Gln Asn Glu Tyr Arg Phe Asp Asn Ile Met Val Asn
 355 360 365

Thr Lys Thr Val Ala Val Glu Pro Lys Glu Asp Gly Val Tyr Val Thr
 370 375 380

Phe Glu Gly Ala Asn Ala Pro Lys Glu Pro Gln Arg Tyr Asp Ala Val
 385 390 395 400

Leu Val Ala Ala Gly Arg Ala Pro Asn Gly Lys Leu Ile Ser Ala Glu
 405 410 415

Lys Ala Gly Val Ala Val Thr Asp Arg Gly Phe Ile Glu Val Asp Lys
 420 425 430

Gln Met Arg Thr Asn Val Pro His Ile Tyr Ala Ile Gly Asp Ile Val
 435 440 445

Gly Gln Pro Met Leu Ala His Lys Ala Val His Glu Gly His Val Ala
 450 455 460

Ala Glu Asn Cys Ala Gly His Lys Ala Tyr Phe Asp Ala Arg Val Ile
 465 470 475 480

Pro Gly Val Ala Tyr Thr Ser Pro Glu Val Ala Trp Val Gly Glu Thr
 485 490 495

Glu Leu Ser Ala Lys Ala Ser Gly Arg Lys Ile Thr Lys Ala Asn Phe
 500 505 510

Pro Trp Ala Ala Ser Gly Arg Ala Ile Ala Asn Gly Cys Asp Lys Pro
 515 520 525

Phe Thr Lys Leu Ile Phe Asp Ala Glu Thr Gly Arg Ile Ile Gly Gly
 530 535 540

Gly Ile Val Gly Pro Asn Gly Gly Asp Met Ile Gly Glu Val Cys Leu

545 **550** **555** **560**
Ala Ile Glu Met Gly Cys Asp Ala Ala Asp Ile Gly Lys Thr Ile His
 565 **570** **575**
Pro His Pro Thr Leu Gly Glu Ser Ile Gly Met Ala Ala Glu Val Ala
 580 **585** **590**
Leu Gly Thr Cys Thr Asp Leu Pro Pro Gln Lys Lys Lys Gly Ser Lys
 595 **600** **605**
Val Arg Met Glu Lys Leu Arg Ile Lys Gly Met Ser Tyr Thr Met Cys
 610 **615** **620**
Ser Gly Lys Phe Ser Ile Asp Lys Glu Met Ala Glu Thr Gln His Gly
625 **630** **635** **640**
Thr Thr Val Val Lys Val Lys Tyr Glu Gly Ala Gly Ala Pro Cys Lys
 645 **650** **655**
Val Pro Ile Glu Ile Arg Asp Val Asn Lys Glu Lys Val Val Gly Arg
 660 **665** **670**
Ile Ile Ser Ser Thr Pro Leu Ala Glu Asn Thr Asn Ser Val Thr Asn
 675 **680** **685**
Ile Glu Leu Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Val Ile Gly Val
 690 **695** **700**
Gly Asn Ser Ala Leu Thr Leu His Trp Phe Arg Lys Gly Ser Ser Ile
705 **710** **715** **720**
Gly Lys Met Phe Glu Ser Thr Tyr Arg Gly Ala Lys Arg Met Ala Ile
 725 **730** **735**
Leu Gly Glu Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Val Gly Gly
 740 **745**

5 <210> 23
 <211> 750
 <212> PRT
 <213> Virus del Dengue de tipo 2

10 <220>
 <221> CADENA
 <222> (1)..(750)
 <223> Secuencia de aminoácidos que corresponde a PLL3.

<400> 23

Met Gly His His His His His His Ala Met Val Asp Lys Arg Met Ala
1 **5** **10** **15**
Leu Val Glu Leu Lys Val Pro Asp Ile Gly Gly His Glu Asn Val Asp
 20 **25** **30**

Ile Ile Ala Val Glu Val Asn Val Gly Asp Thr Ile Ala Val Asp Asp
 35 40 45
 Thr Leu Ile Thr Leu Asp Leu Glu Met Asp Val Pro Ala Glu Val Ala
 50 55 60
 Gly Val Val Lys Glu Val Lys Val Lys Val Gly Asp Lys Ile Ser Glu
 5 70 75 80
 Gly Gly Leu Ile Val Val Val Glu Ala Glu Gly Thr Ala Ala Ala Pro
 85 90 95
 Lys Ala Glu Ala Ala Ala Ala Pro Ala Gln Glu Ala Pro Lys Ala Ala
 100 105 110
 Ala Pro Ala Pro Gln Ala Ala Gln Phe Gly Gly Ser Ala Asp Ala Glu
 115 120 125
 Tyr Asp Val Val Val Leu Gly Gly Gly Pro Gly Gly Tyr Ser Ala Ala
 130 135 140
 Phe Ala Ala Ala Asp Glu Gly Leu Lys Val Ala Ile Val Glu Arg Tyr
 145 150 155 160
 Lys Thr Leu Gly Gly Val Cys Leu Asn Val Gly Cys Ile Pro Ser Lys
 165 170 175
 Ala Leu Leu His Asn Ala Ala Val Ile Asp Glu Val Arg His Leu Ala
 180 185 190
 Ala Asn Gly Ile Lys Tyr Pro Glu Pro Glu Leu Asp Ile Asp Met Leu
 195 200 205
 Arg Ala Tyr Lys Asp Gly Val Val Ser Arg Leu Thr Gly Gly Leu Ala
 210 215 220
 Gly Met Ala Lys Ser Arg Lys Val Asp Val Ile Gln Gly Asp Gly Gln
 225 230 235 240
 Phe Leu Asp Pro His His Leu Glu Val Ser Leu Thr Ala Gly Asp Ala
 245 250 255
 Tyr Glu Gln Ala Ala Pro Thr Gly Glu Lys Lys Ile Val Ala Phe Lys
 260 265 270
 Asn Cys Ile Ile Ala Ala Gly Ser Arg Val Thr Lys Leu Pro Phe Ile
 275 280 285
 Pro Glu Asp Pro Arg Ile Ile Asp Ser Ser Gly Ala Leu Ala Leu Lys
 290 295 300
 Glu Val Pro Gly Lys Leu Leu Ile Ile Gly Gly Gly Ile Ile Gly Leu
 305 310 315 320
 Glu Met Gly Thr Val Tyr Ser Thr Leu Gly Ser Arg Leu Asp Val Val
 325 330 335

Glu Met Met Asp Gly Leu Met Gln Gly Ala Asp Arg Asp Leu Val Lys
 340 345 350

Val Trp Gln Lys Gln Asn Glu Tyr Arg Phe Asp Asn Ile Met Val Asn
 355 360 365

Thr Lys Thr Val Ala Val Glu Pro Lys Glu Asp Gly Val Tyr Val Thr
 370 375 380

Phe Glu Gly Ala Asn Ala Pro Lys Glu Pro Gln Arg Tyr Asp Ala Val
 385 390 395 400

Leu Val Ala Ala Gly Arg Ala Pro Asn Gly Lys Leu Ile Ser Ala Glu
 405 410 415

Lys Ala Gly Val Ala Val Thr Asp Arg Gly Phe Ile Glu Val Asp Lys
 420 425 430

Gln Met Arg Thr Asn Val Pro His Ile Tyr Ala Ile Gly Asp Ile Val
 435 440 445

Gly Gln Pro Met Leu Ala His Lys Ala Val His Glu Gly His Val Ala
 450 455 460

Ala Glu Asn Cys Ala Gly His Lys Ala Tyr Phe Asp Ala Arg Val Ile
 465 470 475 480

Pro Gly Val Ala Tyr Thr Ser Pro Glu Val Ala Trp Val Gly Glu Thr
 485 490 495

Glu Leu Ser Ala Lys Ala Ser Gly Arg Lys Ile Thr Lys Ala Asn Phe
 500 505 510

Pro Trp Ala Ala Ser Gly Arg Ala Ile Ala Asn Gly Cys Asp Lys Pro
 515 520 525

Phe Thr Lys Leu Ile Phe Asp Ala Glu Thr Gly Arg Ile Ile Gly Gly
 530 535 540

Gly Ile Val Gly Pro Asn Gly Gly Asp Met Ile Gly Glu Val Cys Leu
 545 550 555 560

Ala Ile Glu Met Gly Cys Asp Ala Ala Asp Ile Gly Lys Thr Ile His
 565 570 575

Pro His Pro Thr Leu Gly Glu Ser Ile Gly Met Ala Ala Glu Val Ala
 580 585 590

Leu Gly Thr Cys Thr Asp Leu Pro Pro Gln Lys Lys Lys Gly Ser Asp
 595 600 605

Arg Leu Arg Met Asp Lys Leu Gln Leu Lys Gly Met Ser Tyr Ser Met
 610 615 620

Cys Thr Gly Lys Phe Lys Ile Val Lys Glu Ile Ala Glu Thr Gln His
 625 630 635 640

Gly Thr Ile Val Ile Arg Val Gln Tyr Glu Gly Asp Gly Ser Pro Cys

645 650 655

Lys Ile Pro Phe Glu Ile Met Asp Leu Glu Lys Arg His Val Leu Gly
660 665 670

Arg Leu Ile Thr Val Asn Pro Ile Val Thr Glu Lys Asp Ser Pro Val
675 680 685

Asn Ile Glu Ala Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Ile Ile Gly
690 695 700

Val Glu Pro Gly Gln Leu Lys Leu Asn Trp Phe Lys Lys Gly Ser Ser
705 710 715 720

Ile Gly Gln Met Phe Glu Thr Thr Met Arg Gly Ala Lys Arg Met Ala
725 730 735

Ile Leu Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Leu Gly Gly
740 745 750

- 5 <210> 24
- <211> 142
- <212> PRT
- <213> Virus del Dengue de tipo 2

- 10 <220>
- <221> CADENA
- <222> (1)..(142)
- <223> Secuencia de aminoácidos que corresponde a DomB de la proteína de la envuelta del virus DEN-2.

- <400> 24

Arg Leu Arg Met Asp Lys Leu Gln Leu Lys Gly Met Ser Tyr Ser Met
1 5 10 15

Cys Thr Gly Lys Phe Lys Ile Val Lys Glu Ile Ala Glu Thr Gln His
 20 25 30

Gly Thr Ile Val Ile Arg Val Gln Tyr Glu Gly Asp Gly Ser Pro Cys
 35 40 45

Lys Ile Pro Phe Glu Ile Met Asp Leu Glu Lys Arg His Val Leu Gly
 50 55 60

Arg Leu Ile Thr Val Asn Pro Ile Val Thr Glu Lys Asp Ser Pro Val
65 70 75 80

Asn Ile Glu Ala Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Ile Ile Gly
 85 90 95

Val Glu Pro Gly Gln Leu Lys Leu Asn Trp Phe Lys Lys Gly Ser Ser
 100 105 110

Ile Gly Gln Met Phe Glu Thr Thr Met Arg Gly Ala Lys Arg Met Ala
 115 120 125

Ile Leu Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Leu Gly Gly
 130 135 140

Lic. Manuel Selman-Housein Sosa.
Representante Legal.
CIGB.

REIVINDICACIONES

1. Una preparación farmacéutica **caracterizada por** ser una vacuna, conteniendo dicha vacuna como antígeno inmunizante la proteína de cápside de uno o varios serotipos del virus del Dengue en una forma recombinante para su uso en un procedimiento de inducción de una respuesta inmunitaria protectora contra el virus del Dengue en el organismo receptor por activación inmunológica, donde dicha activación inmunológica es el aumento de inducción de anticuerpos antivíricos específicos de serotipo en un sujeto por un antígeno Dengue heterólogo.
2. Una preparación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho antígeno Dengue heterólogo es el dominio III de la proteína de envoltura de un virus del Dengue.
3. Una preparación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 **caracterizada por que** contiene la proteína de cápside del virus del Dengue 1, 2, 3 o 4, sola, mezclada o combinadas entre ellas.
4. Una preparación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** contiene la proteína de cápside mezclada o combinada con antígenos capaces de inducir una respuesta humoral y/o celular.
5. Una preparación de acuerdo con las reivindicaciones 1-4 para su uso en el procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1-4, **caracterizada por que** contiene la proteína de cápside mezclada con una o varias proteínas identificadas en la lista de secuencias como Secuencia ID. N° 20, Secuencia ID. N° 21, Secuencia ID. N° 22 y Secuencia ID. N° 23.
6. Una preparación de acuerdo con las reivindicaciones 1-5 para su uso en el procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1-5, **caracterizada por que** contiene la proteína de cápside fusionada química o genéticamente con una o varias secuencias identificadas en la lista de secuencias como Secuencia ID. N° 17, Secuencia ID. N° 18, Secuencia ID. N° 19 y Secuencia ID. N° 24.
7. Una preparación farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 1-6 para su uso en el procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6 **caracterizada por que** contiene la proteína de cápside en forma agregada o particulada.
8. Una preparación farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 1-7 para su uso en el procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7 **caracterizada por que** contiene un vehículo farmacológicamente aceptable y un adyuvante oleoso o no oleoso.
9. Una preparación farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 1-8 para su uso en el procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8 **caracterizada por que** es un agente preventivo o terapéutico contra el virus del Dengue, por uso vía oral, intramuscular, subcutánea, mucosa o intravenosa.

Figura 1.

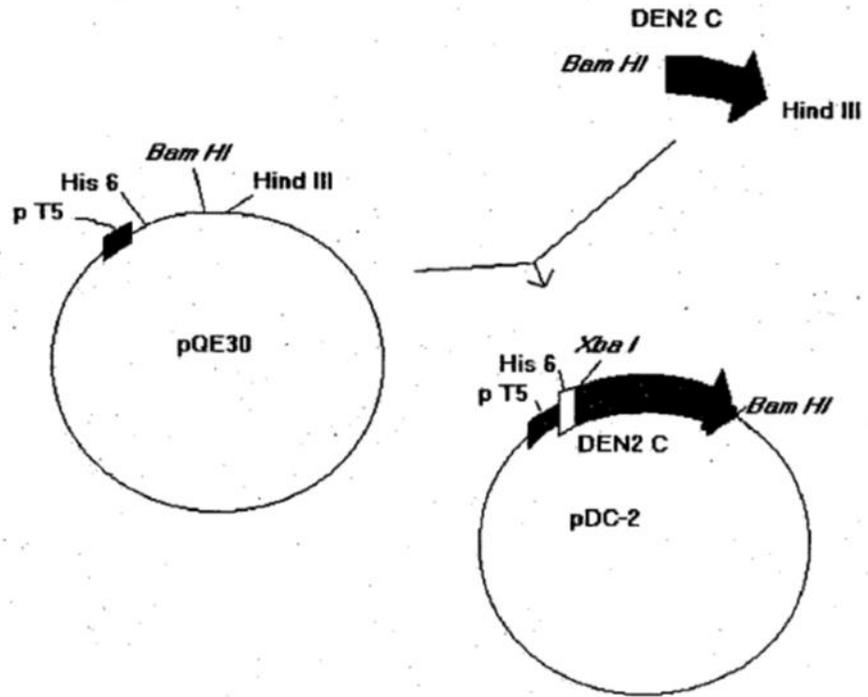


Figura 2.

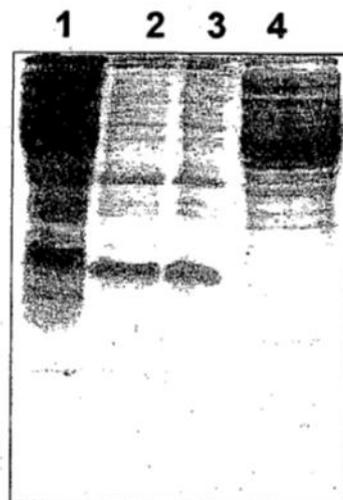


Figura 3.

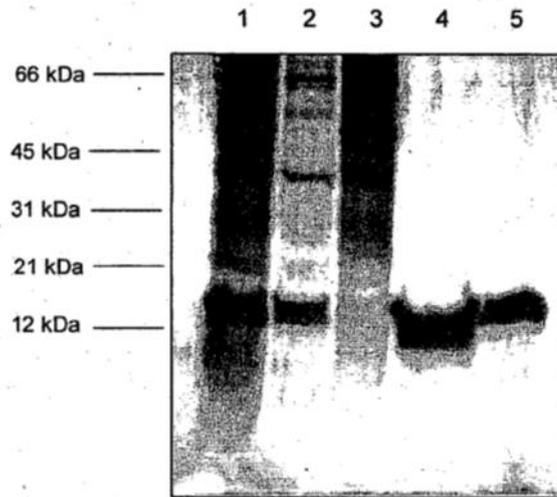


Figura 4.

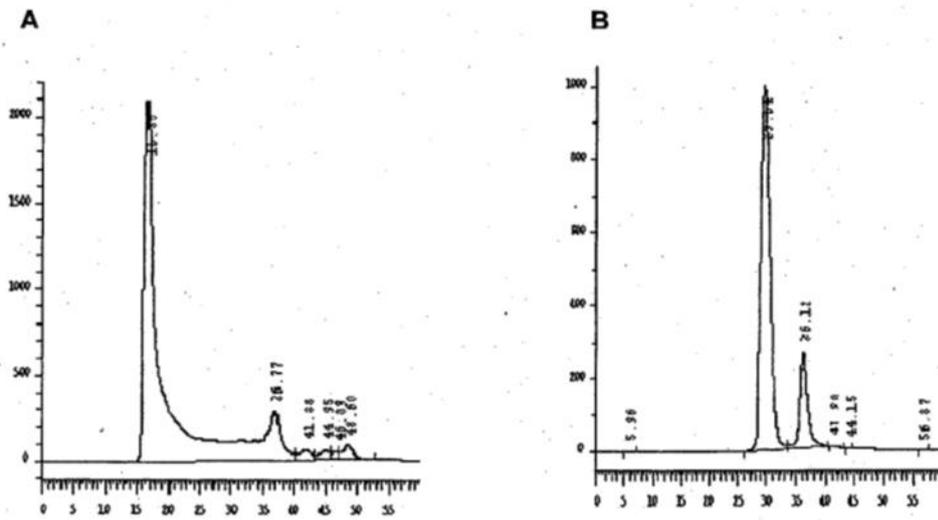


Figura 5.

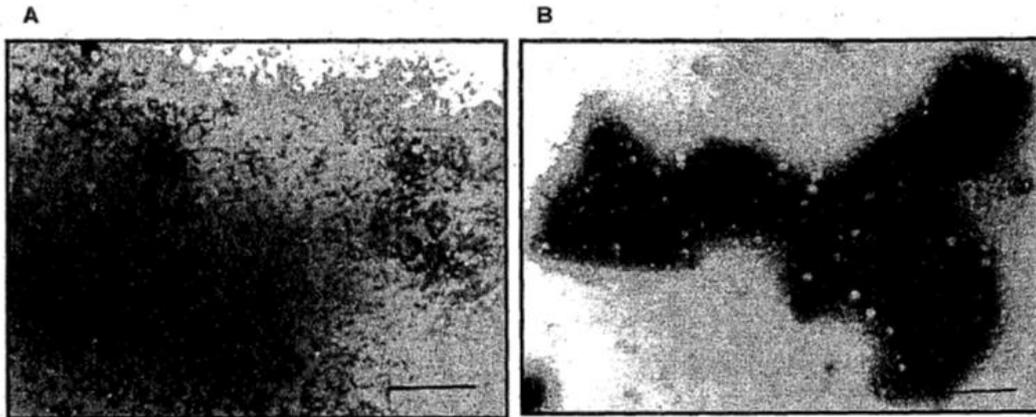


Figura 6.

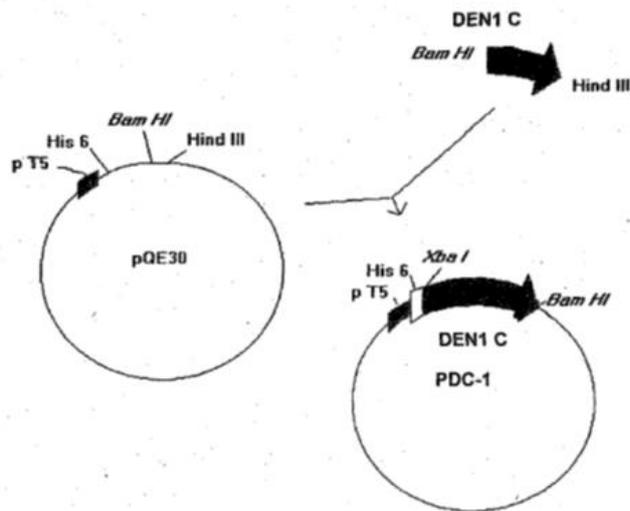


Figura 7.

