

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 517 615**

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: **02.11.2007 E 07874490 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.07.2014 EP 2086526**

54 Título: **Inducción de una respuesta inmunitaria frente al virus del dengue usando un enfoque de sensibilización-refuerzo**

30 Prioridad:

**09.11.2006 US 860233 P**

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

**03.11.2014**

73 Titular/es:

**THE UNITED STATES OF AMERICA AS  
REPRESENTED BY THE SECRETARY OF THE  
NAVY (100.0%)**

**Naval Medical Research Center, Code 00L 503  
Robert Grant Avenue  
Silver Spring, MD 20910, US**

72 Inventor/es:

**SIMMONS, MONIKA;  
PORTER, KEVIN, R.;  
WELLINGTON, SUN y  
KANAKATTE, RAVIPRKASH**

74 Agente/Representante:

**FERNÁNDEZ-VEGA FEIJOO, María Covadonga**

**ES 2 517 615 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

Inducción de una respuesta inmunitaria frente al virus del dengue usando un enfoque de sensibilización-refuerzo

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

10 El contenido inventivo se refiere a una composición para la inducción de inmunidad de larga duración frente a la infección por el virus del dengue.

**Antecedentes**

15 El virus del dengue, el agente causante del dengue (D) y el dengue hemorrágico (DH), es un virus del género *Flavivirus*, un virus de ARN con envuelta monocatenario con polaridad positiva. Su ARN codifica para aproximadamente 3.400 aminoácidos. El virus existe como cuatro serotipos antigénicamente distinguibles.

20 El dengue es la infección humana por arbovirus más común a nivel mundial y una grave preocupación de salud pública que representa estimaciones de 100 millones de infecciones al año (OMS 1986; Monath y Heinz 1996; Thomas, *et al* 2003). El D y el DH se encuentran en la mayor parte de zonas tropicales incluyendo África, Asia, el Pacífico, Australia y América.

25 Aunque el virus puede crecer en una variedad de especies de mosquitos, incluyendo *Aedes albopictus*, *Aedes polynesiensis* y *Aedes scutellaris*, *Aedes aegypti* es el vector de mosquito más eficaz debido a su hábitat doméstico (Gubler 1988). Se han identificado cuatro serotipos antigénicamente distintos del virus del dengue que causan todos ellos enfermedades humanas (Gubler, *et al* 1979; Henchal y Putnak 1990). Cada uno de los cuatro serotipos, aunque distinto, es lo suficientemente similar a los demás como para provocar sólo protección cruzada parcial tras la infección (OMS 1986). Tras la infección, se detecta viremia normalmente pronto en la aparición de síntomas (Halstead 1997). Aunque muchas infecciones por dengue son leves, algunas infecciones dan como resultado DH y síndrome de choque por dengue (SCD), que son potencialmente mortales. Esto se produce habitualmente en un número pequeño de personas durante una segunda infección causada por un virus del dengue que es diferente del virus que causó la primera infección (Halstead 1997).

35 La infección por el virus del dengue se produce tras la picadura de mosquitos *Aedes* infectados por el virus del dengue, que se infectaron anteriormente al alimentarse de seres humanos infectados. Los síntomas de la infección por dengue incluyen fiebre alta, cefalea intensa, dolor retroorbitario, desarrollo de un sarpullido, náuseas, dolor articular y muscular, y habitualmente comienza en el plazo de cinco a seis días tras la picadura de un mosquito infectado. Los síntomas de DH también incluyen hemorragia subdérmica notable, que causa un hematoma purpúreo, así como hemorragia de la nariz, las encías y del tracto gastrointestinal (GI). La tasa de letalidad asociada con DH es del 6 al 30%, produciéndose la mayor parte de las muertes en lactantes. El manejo de DH es sintomático y de apoyo, y tiene como objetivo la reposición de la pérdida de líquidos (Nimmannitya 1996).

45 No es posible realizar un diagnóstico preciso de D leve o clásico basándose en un cuadro clínico solo puesto que muchos síntomas de D se asemejan a los de otras enfermedades, tales como infección por chikungunya (Nimmannitya 1996), sarampión, gripe e infecciones por *Rickettsia*. El diagnóstico diferencial debe incluir paludismo y otras enfermedades virales, bacterianas y producidas por *Rickettsia*. Los métodos de diagnóstico para la infección se basan normalmente en la detección de virus, antígenos virales, secuencias genómicas y la detección de anticuerpos específicos frente al dengue (Shu y Huang 2004). El DH puede diagnosticarse, en algunos casos, de manera más precisa basándose en signos y síntomas clínicos, incluyendo fiebre alta continuada durante de 2 a 7 días, hepatomegalia, hemoconcentración, choque y trombocitopenia.

55 La mayoría de infecciones dan como resultado D, que es autolimitante. Sin embargo, el DH y el SCD son potencialmente mortales. Aunque se han autorizado vacunas contra otros flavivirus, tales como de la fiebre amarilla y la encefalitis japonesa, no existen actualmente vacunas eficaces para proteger frente al D, DH o SCD.

60 Existen actualmente dos candidatos de vacuna tetravalente de virus vivos atenuados (VTVA) frente al dengue. Sin embargo, estas dos vacunas pueden ser o bien reactógenas o bien escasamente inmunogénicas en algunos receptores. Las alternativas prometedoras incluyen vacunas de virus quiméricos (por ejemplo, frente a la fiebre amarilla/dengue), de proteínas recombinantes, de virus inactivados y de ácido nucleico (ADN). Las vacunas de ADN pueden ser particularmente útiles para provocar una respuesta inmunitaria mediada por células así como una humoral.

65 La evidencia experimental sugiere que, en primates no humanos, las vacunas de ADN frente al dengue, administradas solas, requieren varias administraciones de refuerzo e intervalos prolongados entre las administraciones para inducir una inmunidad protectora. Otras vacunas no replicativas tales como las vacunas inactivadas purificadas pueden inducir a menudo altos títulos de anticuerpo neutralizante pero estas vacunas pueden

ser malos inductores de memoria inmunológica a largo plazo. Por tanto, es necesario un método y una composición de inmunización seguros, eficaces para la inducción más oportuna de inmunidad de larga duración frente a la infección por el virus del dengue.

- 5 Aunque Konishi, E. *et al.*: Dengue tetravalent DNA vaccine inducing neutralizing antibody and anamnestic responses to four serotypes in mice. *Vaccine*, vol. 24, n.º 12, 2200-2207; Mota, J. *et al.* (2005) Induction of protective antibodies against dengue virus by tetravalent DNA immunization of mice with domain III of the envelope protein. *Vaccine*, vol. 23, n.º 26, 3469-3476; y Apt, D. *et al.* (2006) Tetravalent neutralizing antibody response against four dengue serotypes by a single chimeric dengue envelope antigen. *Vaccine*, vol. 24, n.º 3, 335-344, da a conocer cada uno  
10 vacunas de ADN tetravalentes frente al virus del dengue que se han usado en regímenes de sensibilización-refuerzo, todos sugieren combinar la vacuna de ADN tetravalente respectiva con un refuerzo de proteínas (Apt, D. *et al.*), para aumentar la eficacia (Konishi, E. *et al.*), o proteínas recombinantes (Mota, J. *et al.*).

**Breve resumen de invención**

15 La invención se refiere a una composición para su uso en un método de inducción de inmunidad de larga duración frente a la infección por el virus del dengue según la reivindicación 1. La siguiente descripción también explica, en beneficio de la divulgación completa y la descripción exhaustiva y, por tanto, para un mejor entendimiento, métodos de inducción de una respuesta inmunitaria frente al virus del dengue, por ejemplo un método para la inducción de  
20 una respuesta inmunitaria frente al virus del dengue con reactogenicidad reducida mediante la sensibilización del sujeto con un inmunógeno no replicativo y el refuerzo con una vacuna viral tetravalente de virus vivos atenuados. Los ejemplos de inmunógenos no replicativos incluyen vacunas de ADN tetravalentes que contienen secuencias de ADN que codifican para proteínas del virus del dengue o vacunas de proteínas del virus del dengue inactivadas purificadas tetravalentes.

25 Se describen además en beneficio de la completitud, métodos de inducción de una respuesta inmunitaria frente al virus del dengue mediante regímenes de vacunación de sensibilización-refuerzo heterólogo. Las composiciones de sensibilización y refuerzo contienen diferentes sistemas de expresión que codifican para y que expresan proteínas virales del dengue. Los sistemas de expresiones incluyen vectores de expresión adenovirales, vectores de expresión de ADN y sistemas de expresión de replicones del virus de la encefalitis equina venezolana.  
30

**Breve descripción de los dibujos**

35 Figura 1. Gráficos que ilustran respuestas de anticuerpos de inmunoglobulina (IgG) sérica de primates no humanos inmunizados con una vacuna de ADN tetravalente (ADNT) frente al dengue, una vacuna inactivada purificada tetravalente (VIPT) frente al dengue, seguidas por una vacuna tetravalente de virus vivos atenuados (VTVA) frente al dengue. Las muestras se sometieron a prueba mediante ELISA a una dilución 1:100.

40 Figura 2. Gráficos de barras que ilustran anticuerpo neutralizante en el día 60 tras la inmunización de monos con una vacuna de ADN tetravalente (ADNT) frente al dengue, una vacuna inactivada purificada tetravalente (VIPT) frente al dengue y una vacuna tetravalente de virus vivos atenuados (VTVA) frente al dengue.

**Descripción de realizaciones preferidas**

45 **MÉTODO DE SENSIBILIZACIÓN-REFUERZO USANDO ADN/VIPT/VTVA**

50 Existe la necesidad de la inducción de una respuesta inmunitaria eficaz, de larga duración frente a la infección por el virus del dengue. Para satisfacer esta necesidad crítica, la invención contemplada comprende métodos de inmunización que usan ADN del virus del dengue o proteínas del virus del dengue inactivadas como inmunógeno de sensibilización con virus del dengue vivo atenuado como inmunógeno de refuerzo en un esquema de inmunización de sensibilización-refuerzo (véanse los ejemplos 1 y 2). La respuesta inmunitaria resultante tiene mayor eficacia y seguridad.

55 Los virus vivos atenuados (VVA) presentan a menudo respuestas inmunitarias significativamente elevadas con respecto a otras composiciones inmunitarias, pero también presentan frecuentemente reactogenicidad perjudicial. Con el fin de mejorar la inmunogenicidad de vacunas contra el dengue, reduciendo a la vez la reactividad potencial, un aspecto de la presente invención contempla un método para la inducción de inmunidad frente al virus del dengue que comprende administrar una vacuna de ADN tetravalente (ADNT) o una vacuna inactivada purificada tetravalente (VIPT) como inmunógeno de sensibilización seguida por un refuerzo con un virus tetravalente vivo atenuado (VTVA).  
60 El fundamento inventivo es que la sensibilización con vacunas no replicativas, tales como de ADN o proteínas, generarán una respuesta inmunitaria que reducirá la reactogenicidad y mejorará la inmunogenicidad de la VTVA (véase el ejemplo 1).

65 **MÉTODO DE SENSIBILIZACIÓN-REFUERZO HETERÓLOGO USANDO REPLICÓN DE VEE/VECTOR DE EXPRESIÓN DE ADN/VECTOR DE EXPRESIÓN DE ADENOVIRUS**

La invención también contempla el uso de un replicón del virus de la encefalitis equina venezolana (VEE) o vector de adenovirus para expresar proteínas del virus del dengue como o bien una sensibilización o bien un refuerzo, que se describe en detalle en el ejemplo 3. En los métodos de inmunización inventivos contemplados, o bien vectores de expresión de adenovirus, o bien un vector de expresión de ADN o bien un replicón de VEE, que contienen cada uno secuencias de ADN del virus del dengue, comprenden la inmunización de sensibilización. De manera posterior a la inmunización de sensibilización, se administra un refuerzo heterólogo como o bien vector de expresión de adenovirus o bien replicón de VEE, que contienen cada uno secuencias que codifican para proteínas del virus del dengue (véase la tabla 2).

**Ejemplos**

*Ejemplo 1: Composición y método de inducción de respuesta contra el dengue usando ADNT/VIPT/VTVA*

Se sensibilizaron grupos de macacos Rhesus (N = 4) con o bien dos (2) dosis de ADNT, o bien una dosis de VIPT o bien una dosis de VTVA, seguido por un refuerzo con VTVA. Se preparó la VTVA frente al dengue mediante pases en serie de cuatro aislados de virus monovalentes de tipo natural en células renales primarias de perro (PDK). Se sometieron a prueba los virus sometidos a pases, en monos Rhesus en los que indujeron niveles significativamente inferiores de viremia en comparación con virus parentales de tipo natural no sometidos a pases. Luego se propagaron en células pulmonares de fetos de macacos Rhesus (FRhL) y se combinaron para preparar la formulación de VTVA. La formulación inventiva contempla que puede utilizarse cualquier combinación de cepas y proteínas del virus del dengue. Una realización preferida, ilustrada en este ejemplo, consiste en DEN 1 PDK 27, DEN 2 PDK 50, DEN 3 PDK 20 y DEN 4 PDK 6.

El ADNT puede consistir en secuencias o constructos de ADN que codifican para cualquier proteína del dengue. Una realización preferida, que se ilustra en este ejemplo, consiste en los genes de región premembrana (prM) y de la envuelta (E) de DEN 1 West Pac, DEN 2 de tipo natural/Phil + dominio de proteína de membrana asociada a lisosoma (LAMP), DEN 3 de tipo natural/Phil y DEN 4 de tipo natural/Phil. El constructo de DEN 2 tiene un reemplazo de los dominios transmembrana C-terminales y citoplasmáticos de E por LAMP.

De manera similar, VIPT puede ser una combinación de una o más proteínas del virus del dengue inactivadas purificadas. Como ilustración, en una realización preferida, la VIPT consiste en la proteína del núcleo (C), la región premembrana (prM), la envuelta (E) y la proteína no estructural 1 (NS1) de DEN 1 (West Pac), DEN 2 (S16803), DEN 3 (CH53489) y DEN 4 (TVP-360). Se hicieron crecer los virus en células Vero, se purificaron, se inactivaron con formalina y se adsorbieron sobre hidróxido de aluminio al 0,1%.

Haciendo referencia a la figura 1, las respuestas de anticuerpo medidas mediante ELISA demostraron respuestas inmunitarias tetravalentes y altos títulos de IgG específica del dengue en todos los grupos, que se mantuvieron hasta el día de exposición. Haciendo referencia a la figura 2, se demostraron anticuerpos neutralizantes (AcN) de virus de bajo título contra DEN-1, DEN-3 y DEN-4 después de la sensibilización en todos los grupos tratados con vacuna. Los AcN contra DEN-2 fueron los más altos en los animales que recibieron la VTVA (GMT = 1216) seguidos por los grupos que recibieron VIPT (GMT = 347) y ADNT (GMT = 126). Los títulos de AcN alcanzaron un máximo un mes después del refuerzo con VTVA y luego disminuyeron a lo largo del tiempo en todos los grupos. Se observaron los títulos de AcN tetravalentes más persistentes con el régimen de VIPT/VTVA.

Seis meses después de la vacunación de refuerzo, se expusieron todos los animales vacunados y un grupo control no vacunado al virus DEN-3 vivo, no atenuado. Tal como se muestra en la tabla 1, se midió la viremia en suero durante 10 días después de la exposición al virus vivo para evaluar la protección. Se observó una protección completa frente a la viremia en el grupo tratado con VTVA/VTVA y el grupo tratado con VIPT/VTVA. Tres de cuatro animales en el grupo con ADNT/ADNT/VTVA presentaron de 1 a 3 días de viremia (media = 1,5 días) en comparación con controles no vacunados, que tuvieron una media de 4,75 días de viremia. La medición de títulos de AcN frente al virus 14 días después de la exposición mostró un aumento de 2-5 veces y uno de 2-10 veces en los grupos con VIPT/VTVA y con VTVA/VTVA respectivamente, mientras que el régimen con ADNT/VTVA dio como resultado un aumento de 6-53 veces.

Tabla 1

		Viremia después de la exposición										
Grupo	Mono	Días de viremia										Media de días de viremia (para el grupo)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
ADN/ADN/VVA	A71	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1,5
	856Z	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	894Z	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
	922Z	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	
VIP/VVA	890Z	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

	A63Z	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	916Z	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	A96Z	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
													0,0
VVA/VVA	P146	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	860Z	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	3158	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	928Z	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
													0,0
SAL/SAL	914Z	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
	B85	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+		
	868Z	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-		
	898Z	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-		
													4,75

La conclusión a partir de estos estudios demuestra que la sensibilización con VIPT dio como resultado un aumento de la inmunogenicidad de vacuna y la eficacia protectora en comparación con la sensibilización con ADNT, y no previno un refuerzo eficaz con VTVA.

5

*Ejemplo 2: Uso profético de ADNT/VIPT/VTVA para inducir inmunidad humana*

Un aspecto de la presente invención es un método de administración de ADNT/VIPT seguido por la formulación de VTVA a seres humanos con el fin de inducir una respuesta inmunitaria contra el dengue. El ADNT, la VIPT y la VTVA pueden componerse de cualquier secuencia génica o cepa del dengue, tal como se ilustró en el ejemplo 1.

10

Pueden usarse otros métodos de administración. Sin embargo, como ilustración del método inventivo contemplado, se da a conocer el siguiente ejemplo profético como realización preferida. En el ejemplo profético, se administra el ADNT por vía intramuscular como un total de 5 mg (1,25 mg/serotipo) usando el sistema de inyección sin aguja Biojector. Se proporciona el ADNT como dos dosis, separadas un mes. Se proporciona la VIPT como sólo una dosis de 4 ug (1 ug/serotipo) por vía intramuscular, usando una aguja y una jeringa. Se proporciona la VTVA como 5 logs/serotipo por vía subcutánea usando una aguja y una jeringa.

15

*- Ejemplo 3: Ejemplos proféticos de inmunización de sensibilización-refuerzo usando composiciones de replicones de VEE, de sistemas de expresión de adenovirus o de sistemas de expresión de ADN*

20

El método de inmunización contemplado comprende varias composiciones de sensibilización/refuerzo potenciales que usan un replicón de VEE, un sistema de expresión de adenovirus o un sistema de expresión de ADN, conteniendo cada sistema secuencia génicas del dengue. En la tabla 2 se ilustran composiciones y combinaciones preferidas de sensibilización-refuerzo.

25

Tabla 2: Combinaciones de composiciones de sensibilización-refuerzo

Sensibilización	Refuerzo
Sistema de expresión de ADN	Vector de expresión de adenovirus
Sistema de replicones del VEE	Vector de expresión de adenovirus
Sistema de expresión de ADN	Sistema de replicones del VEE
Vector de expresión de adenovirus	Sistema de replicones del VEE

Por ejemplo, el vector de expresión de adenovirus, enumerado en la tabla 2, puede ser cualquier vector de expresión adenoviral. El vector de expresión adenoviral contemplado tiene los genes E1 y E4 eliminados, que se reemplazan por los genes de región premembrana (prM) y de la envuelta (E) de o bien DEN 1 y DEN 2 o bien DEN 3 y DEN 4. Por tanto, se administra la composición adenoviral contemplada como o bien un solo vector adenoviral que expresa genes de sólo dos cepas del dengue (es decir, DEN 1 y 2 ó 3 y 4) o bien una mezcla de 2 vectores adenovirales, expresando un vector DEN 1 y 2 y expresando el otro DEN 3 y 4.

30

35

El sistema de expresión de ADN es cualquier sistema de expresión de ADN adecuado que puede presentar expresión *in vivo*. Un sistema preferido es pVR1012 (véase la patente n.º 6.455.509 concedida a Kochel, *et al*). En esta composición, se inserta una secuencia o un constructo de ADN que codifica para genes de membrana y de la envuelta del dengue para cualquiera de DEN 1, 2, 3 ó 4 en el interior del plásmido. Por tanto, la composición es o bien un solo plásmido que contiene genes frente a una sola cepa del dengue o bien una mezcla de 2 o más plásmidos que contienen cada uno genes de diferentes cepas del dengue.

40

De manera similar al sistema de expresión de ADN, el sistema de replicones (VRP) de la encefalitis equina venezolana (VEE) contiene proteínas de la región premembrana y de la envuelta de cualquiera de DEN 1, 2, 3 ó 4. Como la composición de vacuna de ADN, la composición de VRP es o bien un solo VRP que contiene genes frente a una sola cepa del dengue o bien una mezcla de 2 o más sistemas VRP que contienen cada uno genes de

45

diferentes cepas del dengue. Se clonan los genes prM y E del dengue en un vector de plásmido que contiene el genoma de VEE, reemplazando los genes de glicoproteína y la cápside de VEE. Este plásmido recombinante contiene todas las secuencias (excepto la glicoproteína y la cápside de VEE) para empaquetar el ARN en partículas de replicones. Otros dos plásmidos, que contienen cada uno los genes de glicoproteína y la cápside de VEE, proporcionan los elementos que faltan en trans y forman parte del sistema tripartito (tres plásmidos). Se prepara ARN a partir de cada uno de los tres plásmidos mediante transcripción *in vitro*.

Se usa una mezcla de los 3 ARN para transfectar células BHK (riñón de hámster recién nacido). Se traducen los ARN en proteínas en las células transfectadas. Luego, las células BHK transfectadas producen VRP en los que se ha empaquetado el ARN recombinante que contiene genes del dengue. Se purifican estos VRP y se usan como vacuna. Las vacunas de VRP frente al dengue pueden infectar células pero no pueden propagar una nueva progenie.

*Ejemplo 4: Vacunación que usa una composición de sensibilización/refuerzo de sistema de expresión de ADN/replicón de VEE*

Como ilustración, se construyó una vacuna candidata D1ME-VRP que expresa proteínas de región premembrana (prM) y de la envuelta (E) de virus del dengue tipo 1 de un sistema de replicones del virus de la encefalitis equina venezolana (VEE). Se compararon tres regímenes de vacunación (vacuna de ADN de DIME, D1ME-VRP y una vacuna de sensibilización-refuerzo heterólogo con ADN de DD1ME como inmunógeno de sensibilización y D1ME-VRP como inmunógeno de refuerzo) para determinar la inmunogenicidad y la protección frente a la exposición al virus del dengue 1 en un modelo de primate no humano.

Se inmunizaron grupos de 3 y 4 macacos cinomolgos con tres dosis de vacuna de ADN de D1ME (DDD), tres dosis de D1ME-VRP (VVV) o con dos dosis de vacuna de sensibilización de ADN y una tercera dosis de refuerzo de D1ME-VRP (DDV). Se inoculó PBS en un grupo control de animales. Se midió el anticuerpo neutralizante frente al virus mediante una prueba de neutralización por reducción de placas (PNRP) y se determinaron los títulos de neutralización del 50% (PNRP-50) mediante análisis de probit. Se midieron las respuestas de células T mediante ELISPOT de gamma-IFN. Medido 4 semanas después de la inmunización final, el grupo tratado con DDV produjo los títulos de anticuerpo neutralizante frente a virus más altos (PNRP-50 = 2304) seguido por los grupos tratados con VVV (PNRP-50 = 1405) y DDD (PNRP-50 = 1364). Sin embargo, sólo se demostraron respuestas de células T moderadas en animales vacunados con DDD y DDV.

Cinco meses después de la dosis final, se expusieron todos los animales al virus del dengue 1 vivo y se determinó la viremia infectando células Vero con sueros recogidos de extracciones de sangre diarias. Los tres (3) animales control se volvieron virémicos durante 6-7 días (media = 6,3 días). Todos los regímenes de vacunación mostraron una protección significativa frente a la viremia. Los animales inmunizados con DDV estuvieron completamente protegidos frente a la viremia (media = 0 días). Los animales vacunados con DDD y VVV tuvieron una media de días de viremia de 0,66 y 0,75, respectivamente. Por tanto, la respuesta de anticuerpo y la protección provocadas a partir de D1ME-VRP eran comparables a las provocadas a partir de la vacuna de ADN de D1ME. Sin embargo, el enfoque de sensibilización-refuerzo dio como resultado mayores respuestas de anticuerpo y una protección completa.

### Bibliografía

1. Gubler, D.J., S. Nalim, R. Tan, H. Saipan y J. Sulianti Saroso. 1979. Variation in susceptibility to oral infection with dengue viruses among geographic strains of *Aedes aegypti*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 28: 1045-1052.
  2. Gubler, D.I. 1988. Dengue. In *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology*. T.P. Monath (ed.), CRC Press (Boca Raton), págs. 223-260.
  3. Halstead, S.B. 1997. Epidemiology of dengue and dengue hemorrhagic fever. En *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. D.J. Gubler y G. Kuno, editores. Cab international, Londres. 23-44.
  4. Henchal, E.A. y J.R. Putnak. 1990. The dengue viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 3: 376-396.
  5. Monath, T.P. y F.X. Heinz. 1996. Flaviviruses. En *Fields Virology*. B.N. Fields, D.M. Knipe y P.M. Howley, (ed.) Lippincott-Raven, Filadelfia. 961-1034.
  6. Nimmannitya, S. 1996. Dengue and dengue haemorrhagic fever. En *Manson's Tropical Diseases*. G.C. Cook (ed.) W.B. Saunders Company, Ltd (Londres). 721-729.
  7. Shu, P.Y. y J.H. Huang. 2004. Current advances in dengue diagnosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 11 (4): 642-650.
  8. World Health Organization. *Dengue Hemorrhagic Fever: Diagnosis, Treatment and Control*. Ginebra: OMS, 1986.
- Habiéndose descrito la invención, un experto en la técnica apreciará en las reivindicaciones adjuntas que son

posibles muchas modificaciones y variaciones de la presente invención en vista de las enseñanzas anteriores. Por tanto, ha de entenderse que, dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas, puede ponerse en práctica la invención de modo distinto al descrito específicamente.

**REIVINDICACIONES**

1. Composición para su uso en un método de inducción de inmunidad de larga duración frente a la infección por el virus del dengue, comprendiendo la composición una composición de sensibilización y una composición de refuerzo, en la que dicha composición de sensibilización comprende una vacuna de ADN tetravalente que contiene secuencias de ADN que codifican para los genes prM/E de DEN 1, DEN 2, DEN 3 y DEN 4, o una vacuna inactivada purificada tetravalente que consiste en la proteína del núcleo, la región premembrana, la envuelta y la proteína no estructural 1 de DEN 1, DEN 2, DEN 3 y DEN 4, y dicha composición de refuerzo comprende una vacuna tetravalente de virus vivos atenuados que comprende cualquier cepa de cada uno de DEN 1, DEN 2, DEN 3 y DEN 4.
2. Composición según la reivindicación 1 para su uso según la reivindicación 1, en la que dicha secuencia de ADN de DEN 2 es un constructo que tiene un reemplazo de los dominios transmembrana C-terminales y dominios citoplasmáticos de E por un dominio de membrana asociada a lisosoma.
3. Composición según la reivindicación 1 para su uso según la reivindicación 1, en la que dicha composición de refuerzo puede administrarse entre dos semanas y 2 meses después de la administración de dicha composición de sensibilización.

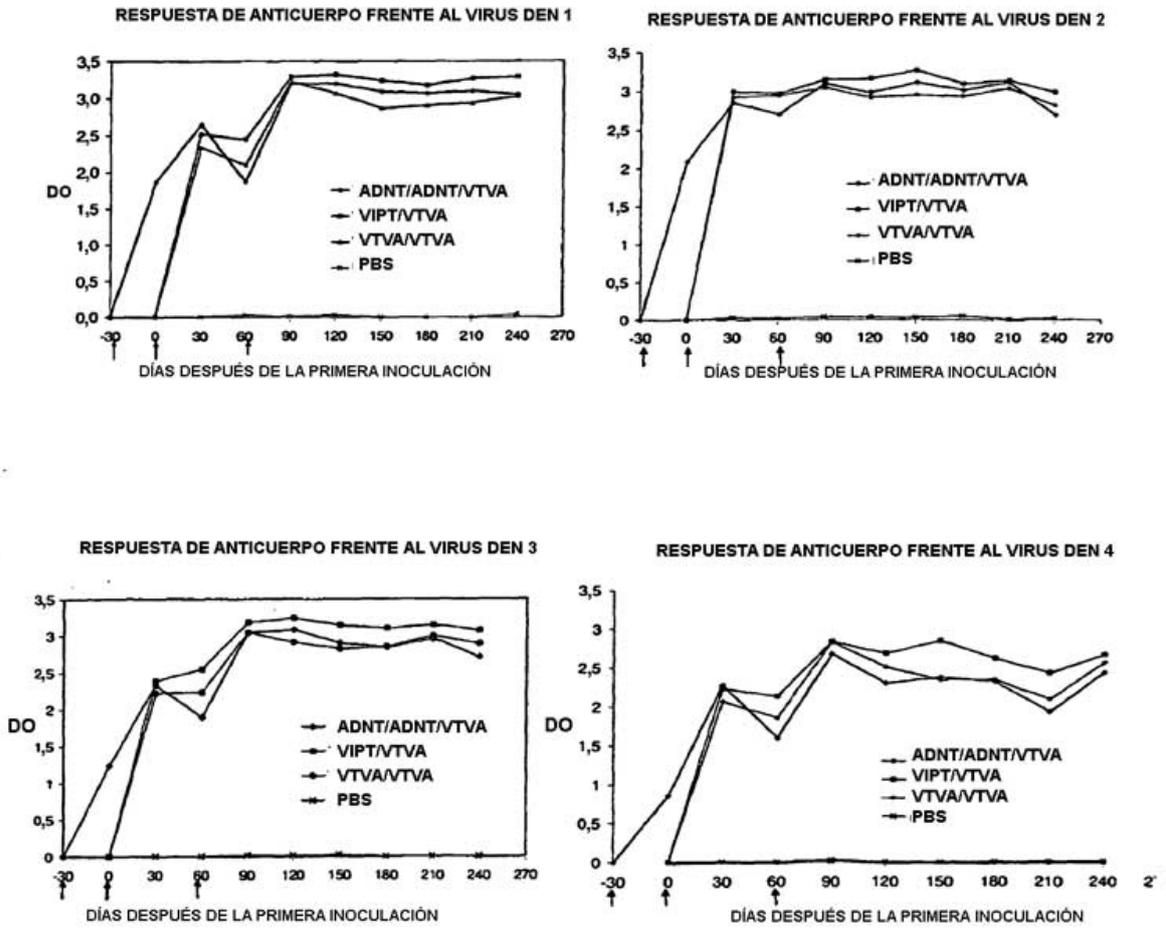


FIG. 1

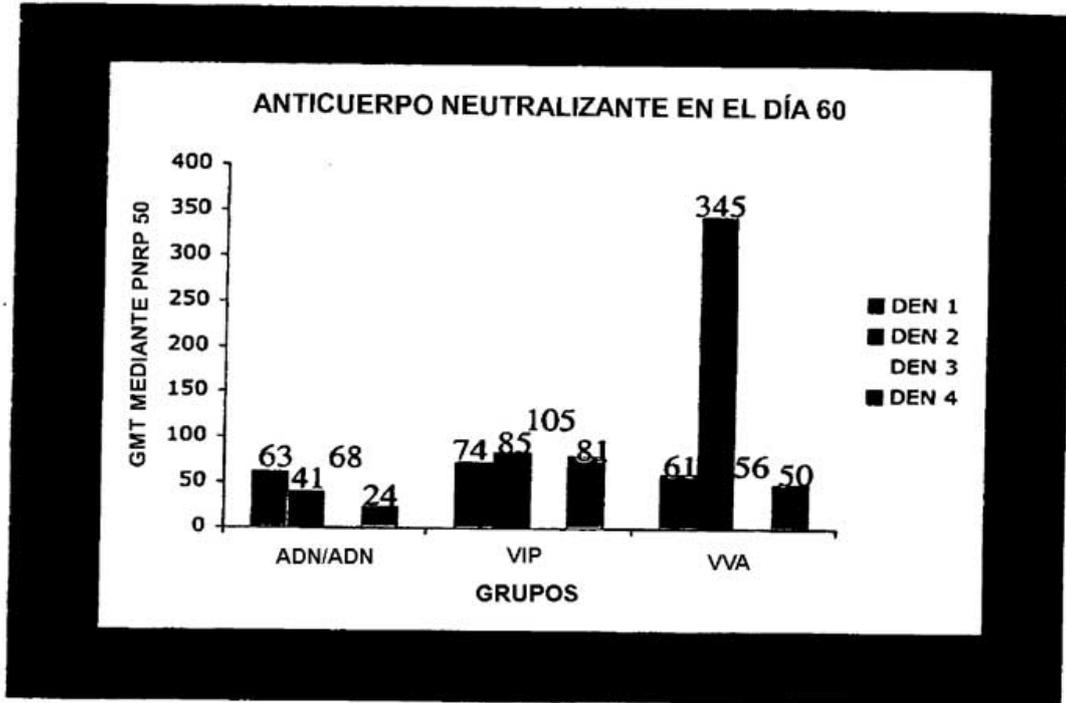


FIG. 2