

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 685 435**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/70** (2006.01)

**C12P 19/34** (2006.01)

**C12N 7/01** (2006.01)

**A61K 39/295** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.01.2009 PCT/US2009/030776**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.08.2009 WO09099716**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.01.2009 E 09707528 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.06.2018 EP 2234624**

54 Título: **Nuevas vacunas frente a múltiples subtipos del virus del dengue**

30 Prioridad:

**11.01.2008 US 20490 P**

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

**09.10.2018**

73 Titular/es:

**INOVIO PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)  
660 W. Germantown Pike, Suite 110  
Plymouth Meeting, PA 19462, US**

72 Inventor/es:

**RAMANATHAN, MATHURA, P. y  
SARDESAI, NIRANJAN, Y.**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 685 435 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**

Nuevas vacunas frente a múltiples subtipos del virus del dengue

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a vacunas para el dengue mejoradas, a métodos mejorados para inducir respuestas inmunitarias, y para inmunizar profiláctica y/o terapéuticamente a individuos frente al virus del dengue.

10 Antecedentes

El virus del dengue (DENV) es un patógeno emergente transmitido por mosquitos que provoca el dengue (D) y una enfermedad grave con peligro la vida, el dengue grave/síndrome de choque por dengue (DG/SCD). El DENV es un virus de ARN pequeño, envuelto y de polaridad positiva que pertenece al género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae*. Se transmiten a los humanos, a través de las picaduras de las especies de mosquitos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*, cuatro subtipos o serotipos distintos de virus del dengue (DV-1 a DV-4). Se ha estimado que cada año se producen 50-100 millones de casos de D y 250.000-500.000 casos de DG. El dengue constituye un importante problema internacional de salud pública, dado que las dos quintas partes de la población mundial vive en regiones endémicas para el dengue y que se estima que anualmente se producen 50-100 millones de casos de infección por dengue. Además, 2.500 millones de personas están en riesgo de infección en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, en ausencia de una intervención eficaz.

Más de 100 países tropicales tienen infecciones endémicas por el virus del dengue y el DG se ha documentado en >60 de estos países. La vigilancia del D/DG es mala en la mayoría de los países y en el pasado se ha centrado principalmente en el DG; por lo tanto, el número de casos de D que se producen cada año solo se puede estimar. En 1998, sin embargo, se produjeron epidemias importantes en Asia y en América, con >1,2 millones de casos de D/DG notificados a la Organización Mundial de la Salud (OMS). Los informes globales sobre DG aumentaron en promedio cinco veces en los últimos 20 años. se estima que a comienzos del siglo XXI se producen cada año entre 50 y 100 millones de casos de D y varios cientos de miles de casos de DG, dependiendo de la actividad epidémica. La tasa de letalidad (CFR, forma siglada de *case fatality rate*) varía entre países, pero en algunos puede ser tan alta como el 10-15 % y en otros de <1 %.

Hay cuatro subtipos de virus del dengue: dengue-1 (DV-1), dengue-2 (DV-2), dengue-3 (DV-3) y dengue-4 (DV-4). Cada uno de estos subtipos forma un subgrupo antigénicamente distinto dentro de la familia de los *flavivirus*. Son virus envueltos, de ARN que codifican diez proteínas: tres proteínas estructurales y siete proteínas no estructurales. Las proteínas estructurales son cápside (C), envoltura (E) y precursor de premembrana (preM). El ciclo de vida intracelular del DV (virus del dengue) comienza con la endocitosis mediada por receptor del virus en las células, seguido de la fusión de la proteína de la envoltura vírica con la membrana endosómica tardía, lo que da como resultado la liberación del genoma vírico en el citoplasma para la replicación.

La infección por el DV puede ser asintomática o caracterizarse por fiebre, escalofríos, cefalea frontal, mialgia, artralgia y exantema. La infección posterior con serotipos distintos puede dar como resultado manifestaciones más graves de la enfermedad, que implican filtración de plasma o hemorragia (dengue hemorrágico) y choque (síndrome de choque por dengue). Aunque a lo largo de los años se han llevado a cabo extensos estudios para comprender la patogenia de la infección por DENV, se ha progresado poco en el desarrollo de compuestos específicos anti-DV. Actualmente no hay agentes antivíricos específicos o vacunas frente a las infecciones por dengue aprobados en los Estados Unidos.

La proteína glicosilada envuelta (E), que es la principal proteína estructural presente en la superficie de los viriones del dengue maduros, es una proteína de membrana integral de tipo I. Se ha demostrado que la proteína E del Dengue maduro forma homodímeros de manera antiparalela (orientación cabeza a cola). Cada monómero se pliega en tres dominios distintos, en concreto, el dominio I (DI, el dominio N-terminal central), el dominio II (DII, el dominio de dimerización) y el dominio III (DIII, dominio C-terminal similar a inmunoglobulina (Ig)). El dominio DIII de la proteína E consiste en 100 aminoácidos (restos 303-395) del extremo C-terminal. Se ha sugerido que este dominio es el dominio de reconocimiento y unión al receptor. El pliegue similar a Ig presente en la proteína DIII se asocia comúnmente con estructuras que tienen una función de adhesión. Este dominio se extiende perpendicularmente a la superficie del virus, con una punta que se proyecta en la superficie del virión más lejos que cualquier otra parte de la proteína E. Además, los estudios han demostrado que tanto las proteínas recombinantes DIII como los anticuerpos generados frente a DIII de la proteína E de flavivirus pueden inhibir la entrada de los flavivirus en las células diana. Además, los flavivirus con una mutación en DIII de la proteína E muestran virulencia atenuada o la capacidad de escapar de la neutralización del sistema inmunitario.

El desarrollo de una vacuna segura y eficaz frente a la infección por el virus del dengue sigue siendo un objetivo principal de salud pública. Dado que se cree que la principal correlación de la inmunidad con el virus del dengue es la presencia de anticuerpos neutralizantes, un requisito previo para comparar y optimizar los candidatos de vacunas es la capacidad de medir con precisión las respuestas de anticuerpos neutralizantes provocadas por las vacunas. Se

ha demostrado que una combinación de vacunas que contienen virus vivo atenuado de los cuatro serotipos da lugar a varias complicaciones (Guy B, Almond JW, *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* Mar de 2008;31(2-3):239-52). Además, hay pocos informes sobre el suministro de antígenos del dengue basado en adenovirus. No obstante, el único problema bien reconocido con los sistemas de adenovirus es que se sabe que la mayoría de la población humana tiene anticuerpos frente a uno de los adenovirus y que tales anticuerpos preexistentes pueden provocar que estas vacunas basadas en adenovirus sean ineficaces.

Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de desarrollar una vacuna que proporcione una amplia inmunidad frente a múltiples, y preferentemente los cuatro, serotipos del virus del dengue, o una inmunidad universal, y preferentemente una vacuna que sea económica y eficaz para todos los serotipos. Además, sigue existiendo la necesidad de un método eficaz de suministro de vacunas a un mamífero, tales como de las vacunas de ADN o vacunas de plásmido de ADN, para proporcionar inmunización frente al virus del dengue, ya sea profiláctica o terapéuticamente.

Chen *et al.*, 2007 (*DNA and Cell Biology*, Vol. 26, N.º 6) se refiere a la inducción de inmunidad protectora tetravalente frente a cuatro serotipos de dengue mediante el dominio II de la proteína de la envoltura en tándem.

El documento WO 2007/034507 se refiere a una única proteína recombinante tetravalente del dominio II para su uso en la detección o diagnóstico de anticuerpos específicos frente al dengue.

## Sumario de la invención

La materia objeto para la cual se busca protección es como se define en las reivindicaciones. Un aspecto de la presente invención proporciona plásmidos de ADN capaces de expresar un polipéptido que suscita una respuesta inmunitaria en un mamífero frente a cuatro subtipos de virus del dengue. Las construcciones de ácido nucleico están compuestas por una secuencia de nucleótidos codificante y un promotor unido operativamente a la secuencia de nucleótidos codificante. La secuencia de nucleótidos codificante expresa el polipéptido, en donde el polipéptido incluye el dominio III de la proteína de la envoltura (dominio DIII o DIII) de cuatro subtipos distintos de virus del dengue y en donde la secuencia de nucleótidos codificante comprende la SEQ ID NO: 5. El promotor regula la expresión del polipéptido en el mamífero.

Otro aspecto de la presente invención proporciona vacunas de plásmidos de ADN que son capaces de generar en un mamífero una respuesta inmunitaria frente a una pluralidad de subtipos de virus del dengue. Las vacunas de plásmidos de ADN están compuestas por un plásmido de ADN capaz de expresar un antígeno del dengue consenso en el mamífero y un excipiente farmacéuticamente aceptable. El plásmido de ADN está compuesto por un promotor unido operativamente a una secuencia codificante que codifica el antígeno DIII consenso del dengue. El antígeno consenso del dengue está compuesto por los dominios DIII consenso del subtipo 1 del virus del dengue, el subtipo 2 del virus del dengue, el subtipo 3 del virus del dengue o el subtipo 4 del virus del dengue.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un plásmido de ADN como se describe en el presente documento, para su uso en métodos para suscitar en un mamífero una respuesta inmunitaria frente a una pluralidad de subtipos del virus del dengue, que comprenden suministrar el plásmido de ADN al tejido del mamífero y electroporar células del tejido con un pulso de energía a una corriente constante eficaz para permitir la entrada de los plásmidos de ADN en las células.

## Breve descripción de los dibujos

Los expertos en la materia pueden entender mejor los numerosos objetivos y ventajas de la presente invención por referencia a las figuras adjuntas, en las cuales:

La Fig. 1 presenta un esquema que muestra la organización del genoma del virus del dengue, junto con un modelo conformacional tridimensional de la envoltura del virus del dengue.

La Fig. 2 presenta una fotografía de un gel que muestra el dominio DIII de los cuatro subtipos del dengue y la banda universal DIII.

La Fig. 3 presenta un esquema que muestra la organización del DIII universal para dengue universal (DV-U) con codones optimizados para ser humano y la secuencia de aminoácidos consenso de DV-U-DIII.

La Fig. 4a presenta mapas plasmídicos para los cuatro plásmidos que tienen cada uno un subtipo de dominio DIII.

La Fig. 4b presenta mapas plasmídicos para el plásmido que contiene DV-U-DIII.

La Fig. 5 presenta una fotografía de un gel que muestra transcritos ARNm de DIII en células que expresan DIII de los cuatro subtipos y fragmentos de DV-U clonados en pVAX.

La Fig. 6 presenta fotografías del análisis por inmunofluorescencia indirecta (IFA) de la expresión de construcciones de vacuna de DIII del DV, que tienen el epítipo FLAGGED, en células RD.

La Fig. 7 presenta una fotografía de un gel que muestra la traducción de productos DIII *in vitro*.

La Fig. 8 presenta un gel de SDS-PAGE de lisados de *E. coli* y de muestras purificadas por columna de Ni que detectan la producción de DIII.

La Fig. 9 presenta una línea de tiempo del esquema de vacunación para el DV.

La figura 10 presenta un gráfico de barras de lecturas espectroscópicas que muestra la reacción específica entre el suero anti-DIII de ratones vacunados con pDV-U-DIII y los antígenos DIII de DV-1 a DV-4 capturados en placas ELISA recubiertas de Ni.

La Fig. 11 presenta una fotografía de un gel que muestra la inmunodetección de proteínas DIII mediante análisis por transferencia de Western usando suero anti-DIII de ratones vacunados con pDV-U-DIII.

La figura 12 presenta fotografías que muestran la tinción específica de dominios DIII individuales y combinados, usando suero anti-DIII de ratones vacunados con pDV-U-DIII.

La Fig. 13 presenta fotografías que muestran la tinción de las células Vero infectadas con DV-2 mediante sueros de ratones vacunados con pDV-U-DIII.

La Fig. 14 presenta un gráfico de barras que muestra el título de anticuerpos neutralizantes frente a DV-2.

La Fig. 15 presenta fotografías que muestran la tinción de células infectadas por el virus del dengue con suero de pDV-U DIII.

La Fig. 16 presenta un gráfico que muestra el efecto neutralizante del suero frente a DIII del DV-U frente a los cuatro subtipos de dengue.

La Fig. 17 presenta un gráfico que muestra los resultados de un ensayo ELISpot de linfocitos B: Inducción de células secretoras de anticuerpos anti-DIII mediante pDV-U DIII.

#### Descripción detallada de las realizaciones preferentes

Las siguientes definiciones abreviadas o acortadas se proporcionan para ayudar a entender las realizaciones preferentes de la presente invención. Las definiciones abreviadas dadas aquí no son de ningún modo exhaustivas ni son contradictorias con las definiciones como se entienden en la materia o el significado del diccionario. Las definiciones abreviadas se proporcionan aquí para complementar o definir más claramente las definiciones conocidas en la técnica.

#### Definiciones

La homología de secuencia de nucleótidos y aminoácidos, como se usa en el presente documento, se puede determinar usando FASTA, BLAST y Gapped BLAST (Altschul *et al.*, Nuc. Acids Res., 1997, 25, 3389) y programa informático PAUP\* 4.0b10 (D. L. Swofford, Sinauer Associates, Massachusetts). Brevemente, el algoritmo BLAST, que significa *Basic Local Alignment Search Tool* (herramienta de búsqueda de alineamiento local básica), es adecuado para determinar la similitud de secuencia (Altschul *et al.*, J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410). El programa informático para realizar los análisis BLAST está disponible al público a través del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Una medida de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad con la que sucedería una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a otro si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de ensayo con el otro ácido nucleico es menor de aproximadamente 1, preferentemente menos de aproximadamente 0,1, más preferentemente menos de aproximadamente 0,01 y muy preferentemente menos de aproximadamente 0,001. El "porcentaje de similitud" puede calcularse usando el programa informático PAUP\* 4.0b10 (D. L. Swofford, Sinauer Associates, Massachusetts). La similitud promedio de la secuencia consenso se calcula en comparación con todas las secuencias en el árbol filogenético.

Como se usa en el presente documento, la expresión "construcción de ácido nucleico" se refiere a las moléculas de ADN o ARN que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica proteína. La secuencia codificante o "secuencia codificante de ácido nucleico" puede incluir señales de iniciación y terminación unidas operativamente a elementos reguladores que incluyen un promotor y una señal de poliadenilación capaces de dirigir la expresión en las células del individuo al que se administra la molécula de ácido nucleico.

Como se usa en el presente documento, la expresión "forma expresable" se refiere a construcciones de ácido nucleico que contienen los elementos reguladores necesarios unidos operativamente a una secuencia codificante que codifica una proteína de forma que cuando está presente en la célula del individuo se expresará la secuencia codificante.

El término "corriente constante" se usa en el presente documento para definir una corriente que recibe o experimenta un tejido, o las células que definen dicho tejido, durante la duración de un pulso eléctrico administrado al mismo tejido. El impulso eléctrico se suministra desde los dispositivos de electroporación descritos en el presente documento. Esta corriente permanece a un amperaje constante en dicho tejido a lo largo de la vida de un impulso eléctrico debido a que el dispositivo de electroporación proporcionado en el presente documento tiene un elemento de retroalimentación, preferentemente tiene una retroalimentación instantánea. El elemento de retroalimentación puede medir la resistencia del tejido (o células) durante toda duración del pulso y provocar que el dispositivo de electroporación altere su salida de energía eléctrica (por ejemplo, aumentar el voltaje) para que la corriente en el mismo tejido permanezca constante durante todo el pulso eléctrico (en el orden de microsegundos) y de pulso a pulso. En algunas realizaciones, el elemento de retroalimentación comprende un controlador.

El término "retroalimentación" o "retroalimentación de corriente" se usa indistintamente y significa la respuesta activa

de los dispositivos de electroporación proporcionados, que comprende medir la corriente en el tejido entre los electrodos y modificar en consecuencia la salida de energía suministrada por el dispositivo de EP, para mantener la corriente a un nivel constante. Un usuario preestablece este nivel constante antes del inicio de una secuencia de pulsos o tratamiento eléctrico. Preferentemente, la retroalimentación se logra mediante el componente de electroporación, por ejemplo, un controlador del dispositivo de electroporación, dado que el circuito eléctrico en el mismo tiene la capacidad de controlar la corriente en el tejido entre los electrodos de forma continua y de comparar esa corriente controlada (o corriente dentro del tejido) con una corriente preestablecida, y de hacer de forma continua ajustes de la salida de energía para mantener la corriente controlada a niveles los preestablecidos. En algunas realizaciones, el circuito de retroalimentación es instantáneo ya que es una retroalimentación analógica de bucle cerrado.

Las expresiones "electroporación", "electropermeabilización" o "potenciación electrocinética" ("PE"), como se usa de manera indistinta en el presente documento, se refiere al uso de un pulso de campo eléctrico transmembrana para inducir rutas microscópicas (poros) en una biomembrana; su presencia permite que biomoléculas tales como plásmidos, oligonucleótidos, ARNip, fármacos, iones y/o agua, pasen de un lado de la membrana celular al otro.

El término "corriente descentralizada" se usa en el presente documento para definir el patrón de las corrientes eléctricas suministradas desde las diversas matrices de electrodos de aguja de los dispositivos de electroporación descritos en el presente documento, en donde los patrones minimizan, o preferiblemente eliminan, la aparición del estrés térmico relacionado con la electroporación en cualquier zona del tejido que se está electroporando.

El término "mecanismo de retroalimentación", como se usa en el presente documento, se refiere a un procedimiento realizado por un programa informático o un *hardware* (o soporte lógico incorporado), procedimiento que recibe y compara la impedancia del tejido deseado (antes, durante y/o después del suministro del pulso de energía) con un valor presente, preferentemente corriente, y ajusta el pulso de energía suministrado para alcanzar el valor preestablecido. El término "impedancia" se usa en el presente documento cuando se analiza el mecanismo de retroalimentación y se puede convertir a un valor de corriente de acuerdo con la ley de Ohm, permitiendo así las comparaciones con la corriente preestablecida. En una realización preferente, el "mecanismo de retroalimentación" se realiza mediante un circuito analógico de bucle cerrado.

La expresión "respuesta inmunitaria" se usa en el presente documento para indicar la activación del sistema inmunitario de un hospedador, por ejemplo, la de un mamífero, en respuesta a la introducción de un antígeno del dengue, por ejemplo, el antígeno universal del dengue, a través de las vacunas de plásmido de ADN proporcionadas. La respuesta inmunitaria puede ser en forma de una respuesta celular o humoral, o ambas.

El término "consenso" o la expresión "secuencia consenso" se usa en el presente documento para indicar una secuencia de ácido nucleico sintética, o secuencia polipeptídica correspondiente, construida a base del análisis de un alineamiento de múltiples cepas de un subtipo específico de dengue, que produce las secuencias consenso de DIII del dengue del subtipo 1, el subtipo 2, el subtipo 3, el subtipo 4 y el dengue universal descrito a continuación. El del dengue universal consenso puede usarse para inducir una amplia inmunidad frente a múltiples subtipos o serotipos del virus del dengue.

El término "adyuvante" se usa en el presente documento para indicar cualquier molécula añadida a las vacunas de plásmido de ADN descritas en el presente documento, para potenciar la antigenicidad del antígeno del dengue codificado por los plásmidos de ADN y las secuencias de ácidos nucleicos que se describen en lo sucesivo en el presente documento.

El término "subtipo" o "serotipo" se usa indistintamente en el presente documento y en referencia a un virus, por ejemplo el virus del dengue, y significa variantes genéticas del antígeno del virus de forma que un subtipo es reconocido por un sistema inmunitario distinto al de un subtipo diferente. Por ejemplo, el subtipo 1 del virus del dengue es indistinguible desde el punto de vista inmunológico del subtipo 2 del virus del dengue.

Un aspecto de la presente invención proporciona plásmidos de ADN capaces de expresar un polipéptido que suscita una respuesta inmunitaria en un mamífero frente a cuatro subtipos de virus del dengue. Los plásmidos de ADN están compuestos por una secuencia de nucleótidos codificante y un promotor unido operativamente a la secuencia de nucleótidos codificante. La secuencia de nucleótidos codificante expresa el polipéptido, en donde el polipéptido incluye un dominio DIII de cuatro subtipos distintos de virus del dengue y en donde la secuencia de nucleótidos codificante comprende la SEQ ID NO: 5. El promotor regula la expresión del polipéptido en el mamífero.

En algunas realizaciones, el plásmido de ADN puede incluir adicionalmente una secuencia líder de IgE unida operativamente a un extremo N-terminal de la secuencia codificante y unida operativamente al promotor. Preferentemente, la líder de IgE tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 11. La construcción de ácido nucleico también puede comprender una secuencia de poliadenilación unida al extremo C-terminal de la secuencia codificante. Preferentemente, se optimizan los codones del plásmido de ADN.

La secuencia de nucleótidos codificante codifica un polipéptido que incluye el dominio DIII del subtipo 1 del virus del

Dengue, el subtipo 2 del virus del Dengue, el subtipo 3 del virus del Dengue y subtipo 4 del virus del Dengue. La secuencia de nucleótidos codificante comprende la SEQ ID NO: 5.

En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos codificante es parte de un casete de expresión y puede incluir la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 16. Los casetes de expresión incluyen (del extremo 5' al 3'): un sitio Kpnl, el líder de IgE, la secuencia codificante (DIII), dos codones de terminación y un sitio PstI. Una experto en la materia, provisto con la técnica disponible, puede alterar el casete reemplazando un sitio de empalme (Kpnl o PstI) por sitios de empalme alternativos, la secuencia líder de IgE por una secuencia líder de señalización o direccionamiento alternativa y/o codones de terminación por más o menos codones de terminación.

Otro aspecto de la presente invención proporciona vacunas de plásmidos de ADN que son capaces de generar en un mamífero una respuesta inmunitaria frente a una pluralidad de subtipos de virus del dengue. Las vacunas de plásmidos de ADN están compuestas por un plásmido de ADN capaz de expresar un antígeno del dengue consenso en el mamífero y un excipiente farmacéuticamente aceptable. El plásmido de ADN está compuesto por un promotor unido operativamente a una secuencia codificante que codifica el antígeno consenso del dengue. El antígeno consenso del dengue está compuesto por los dominios DIII consenso del subtipo 1 del virus del dengue, el subtipo 2 del virus del dengue, el subtipo 3 del virus del dengue y el subtipo 4 del virus del dengue. El plásmido de ADN comprende un antígeno consenso del dengue que codifica la SEQ ID NO: 10. El dominio DIII consenso DV-U-DIII, que tiene la secuencia SEQ ID NO: 10, consiste en secuencias enlazadoras que conectan cada uno de los cuatro subtipos de DIII (DV-1-DIII, DV-2-DIII, DV-3-DIII y DV-4-DIII), que tienen la secuencia RGRKRRS, que es un sitio de escisión conocido y permite la escisión de DV-U-DIII en secuencias DIII separadas de un subtipo específico. Sin embargo, la secuencia enlazadora puede ser cualquier otra secuencia enlazadora disponible en la técnica que tenga características similares; y está dentro de la experiencia habitual en la técnica reemplazar tal enlazador por RGRKRRS actualmente utilizada.

En algunas realizaciones, el plásmido de ADN comprende adicionalmente una secuencia líder de IgE unida a un extremo N-terminal de la secuencia codificante y unida operativamente al promotor. Preferentemente, la líder de IgE tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 11. El plásmido de ADN incluye adicionalmente una secuencia de poliadenilación unida al extremo C-terminal de la secuencia codificante. Preferentemente, se optimizan los codones del plásmido de ADN.

En algunas realizaciones, el excipiente farmacéuticamente aceptable es un adyuvante. Preferentemente, el adyuvante se selecciona del grupo que consiste en: IL-12 e IL-15. En algunas realizaciones, el excipiente farmacéuticamente aceptable es un agente que facilita la transfección. Preferentemente, el agente que facilita la transfección es un polianión, policatión o un lípido, y más preferentemente es poli-L-glutamato. Preferentemente, el poli-L-glutamato está a una concentración de menos de 6 mg/ml. Preferentemente, la vacuna de plásmido de ADN tiene una concentración de plásmido de ADN total de 1 mg/ml o mayor.

Las vacunas de plásmido de ADN pueden incluir un plásmido de ADN que comprende las secuencias de nucleótidos codificantes: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:5, y preferentemente la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, el plásmido de ADN comprende al menos dos de las secuencias de nucleótidos codificantes: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones, el plásmido de ADN comprende la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2; en algunas realizaciones, el plásmido de ADN comprende la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 3; en algunas realizaciones, el plásmido de ADN comprende la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 4; en algunas realizaciones, el plásmido de ADN comprende la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 3; en algunas realizaciones, el plásmido de ADN comprende la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 4; en algunas realizaciones, el plásmido de ADN comprende la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 4; en algunas realizaciones, el plásmido de ADN comprende la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 3; en algunas realizaciones, el plásmido de ADN comprende la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 4; en algunas realizaciones, el plásmido de ADN comprende la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 4; o en algunas realizaciones, el plásmido de ADN comprende la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 4; o en algunas realizaciones, el plásmido de ADN comprende la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 4. Preferentemente, el plásmido de ADN comprende la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.

En algunas realizaciones, las vacunas de plásmido de ADN comprenden al menos dos plásmidos de ADN distintos que expresan un dominio DIII del virus del dengue, el plásmido se selecciona del grupo que consiste en: un plásmido de ADN que comprende una secuencia que codifica un dominio DIII consenso del subtipo 1 del virus del dengue, un plásmido de ADN que comprende una secuencia que codifica un dominio DIII consenso del subtipo 2 del virus del dengue, un plásmido de ADN que comprende una secuencia que codifica un dominio DIII consenso del subtipo 3 del virus del dengue y un plásmido de ADN que comprende una secuencia que codifica un dominio DIII consenso del subtipo 4 del virus del dengue. En algunas realizaciones, las vacunas de plásmido de ADN pueden incluir cuatro dominios DIII consenso de subtipos del virus del dengue (subtipos 1-4).

En algunas realizaciones, el dominio DIII consenso del subtipo 1 del virus del dengue tiene una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el dominio DIII consenso del subtipo 2 del virus del dengue tiene una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, el

dominio DIII consenso del subtipo 3 del virus del dengue tiene una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, el dominio DIII consenso del subtipo 4 del virus del dengue tiene una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 4.

5 En algunas realizaciones, el mamífero en el que las vacunas de plásmido de ADN generan una respuesta inmunitaria es un primate. Preferentemente, el mamífero es un primate. La respuesta inmunitaria puede ser una respuesta humoral o una respuesta celular, y preferentemente ambas.

10 Otro aspecto de la presente invención proporciona los plásmidos de ADN descritos en el presente documento, para su uso en métodos para suscitar en un mamífero una respuesta inmunitaria frente a una pluralidad de subtipos del virus del dengue, que comprenden suministrar una vacuna de plásmido de ADN al tejido del mamífero y electroporar células del tejido con un pulso de energía a una corriente constante eficaz para permitir la entrada de los plásmidos de ADN en las células.

15 En algunas realizaciones, los métodos para suscitar una respuesta inmunitaria incluyen una etapa de suministro que comprende inyectar la vacuna de plásmido de ADN en tejido intradérmico, tejido subcutáneo o muscular.

20 En algunas realizaciones, los métodos para suscitar una respuesta inmunitaria pueden comprender adicionalmente preestablecer una corriente que se desea suministrar al tejido; y electroporar células del tejido con un pulso de energía a una corriente constante que es igual a la corriente preestablecida.

25 En algunas realizaciones, los métodos para suscitar una respuesta inmunitaria comprenden adicionalmente medir la impedancia en las células electroporadas; ajustar el nivel de energía del pulso de energía con respecto a la impedancia medida para mantener una corriente constante en las células electroporadas. Las etapas de medición y ajuste se producen dentro de la duración del pulso de energía.

30 En algunas realizaciones, la etapa de electroporación comprende suministrar el pulso de energía a una pluralidad de electrodos de acuerdo con un patrón de secuencia de pulsos, que suministra el pulso de energía en un patrón descentralizado.

35 En algunas realizaciones de la presente invención, las vacunas de plásmido de ADN pueden incluir adicionalmente un adyuvante. En algunas realizaciones, el adyuvante se selecciona del grupo que consiste en: interferón alfa, interferón gamma, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , GM-CSF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), quimiocina atrayente de linfocitos T cutáneos (CTACK), quimiocina epitelial expresada en timo (TECK), quimiocina epitelial asociada a mucosas (MEC), IL-12, IL-15, MHC, CD80, CD86, incluyendo IL-15, que tiene la secuencia señal delecionada e incluyendo opcionalmente el péptido señal de IgE. Otros genes que pueden ser adyuvantes útiles incluyen los que codifican: MCP-1, MIP-1-alfa, MIP-1p, IL-8, RANTES, L-selectina, P-selectina, E-selectina, CD34, GlyCAM-1, MadCAM-1, LFA-1, VLA-1, Mac-1, p150.95, PECAM, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, CD2, LFA-3, M-CSF, G-CSF, IL-4, formas mutantes de IL-18, CD40, CD40L, factor de crecimiento vascular, el factor de crecimiento de fibroblastos, IL-7, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento endotelial vascular, Fas, receptor de TNF, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, Caspasa ICE, Fos, c-jun, Sp-1, Ap-1, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, I $\kappa$ B, NIK inactiva, SAP K, SAP-1, JNK, genes de respuesta al interferón, NF $\kappa$ B, Bax, TRAIL, TRAILrec, TRAILrecDRC5, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, LIGANDO DE RANK, Ox40, LIGANDO DE Ox40, NKG2D, 45 MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAP1, TAP2 y fragmentos funcionales de los mismos. En algunas realizaciones preferentes, el adyuvante selecciona de IL-12, IL-15, CTACK, TECK o MEC.

50 En algunas realizaciones, el excipiente farmacéuticamente aceptable es un agente que facilita la transfección, que puede incluir los siguientes: agentes tensioactivos, tales como complejos inmunoestimulantes (ISCOMS), adyuvante incompleto de Freund, un análogo de LPS incluyendo monofosforil lípido A, muramil péptidos, análogos de quinona, vesículas tales como escualano y escualeno, ácido hialurónico, lípidos, liposomas, iones de calcio, proteínas víricas, polianiones, policationes o nanopartículas, u otros agentes que facilitan la transfección. Preferentemente, el agente que facilita la transfección es un polianión, un polication, incluyendo poli-L-glutamato (LGS) o un lípido. Preferentemente, el agente que facilita la transfección es poli-L-glutamato, y más preferentemente, el poli-L-glutamato está presente en la vacuna de plásmido de ADN a una concentración de menos de 6 mg/ml. En algunas 55 realizaciones, la concentración de poli-L-glutamato en la vacuna de plásmido de ADN es de menos de 4 mg/ml, menos de 2 mg/ml, menos de 1 mg/ml, menos de 0,750 mg/ml, menos de 0,500 mg/ml, menos de 0,250 mg/ml, menos de 0,100 mg/ml, menos de 0,050 mg/ml o menos de 0,010 mg/ml.

60 En algunas realizaciones, la vacuna de plásmido de ADN puede suministrarse a un mamífero para suscitar una respuesta inmunitaria; preferentemente el mamífero es un primate, incluyendo los primates humanos y no humanos, una vaca, cerdo, pollo, perro o hurón. Más preferentemente, el mamífero es un primate humano.

65 Un aspecto de la presente divulgación se refiere a vacunas de plásmidos de ADN para su uso en métodos para suscitar en un mamífero una respuesta inmunitaria frente a una pluralidad de subtipos de un virus. Los métodos incluyen suministrar una vacuna de plásmido de ADN al tejido del mamífero y electroporar células del tejido con un

- pulso de energía a una corriente constante eficaz para permitir la entrada de los plásmidos de ADN en las células. La vacuna de plásmido de ADN comprende un plásmido de ADN capaz de expresar en una célula del mamífero una pluralidad de antígenos consenso obtenidos de los subtipos del virus, para suscitar una respuesta inmunitaria en el mamífero, comprendiendo la pluralidad de antígenos consenso un dominio antigénico de al menos dos subtipos
- 5 distintos del virus. El virus puede seleccionarse de uno de una serie de virus que se sabe que tienen serotipos distintos y, preferentemente, el virus tendrá un dominio antigénico que está altamente conservado en los distintos serotipos. Preferentemente, el virus se selecciona de virus del Nilo Occidental, el virus de la inmunodeficiencia humana, el virus de la gripe o el virus del dengue.
- 10 Un aspecto de la presente invención se refiere a plásmidos de ADN de la invención, para su uso en métodos para suscitar en un mamífero una respuesta inmunitaria frente a una pluralidad de subtipos del virus del dengue. Los métodos incluyen suministrar una vacuna de plásmido de ADN a un tejido del mamífero, comprendiendo la vacuna de plásmido de ADN un plásmido de ADN capaz de expresar en una célula del mamífero un antígeno del dengue
- 15 consenso, para suscitar una respuesta inmunitaria en el mamífero, el del antígeno del dengue consenso comprende secuencias consenso que codifican el dominio III de la proteína de la Envoltura de al menos dos subtipos de dengue, y preferentemente de los cuatro subtipos del dengue. Los subtipos de dengue incluyen subtipo 1, el subtipo 2, el subtipo 3 y el subtipo 4. Los métodos para suscitar una respuesta inmunitaria incluyen electroporar células del tejido con un pulso de energía a una corriente constante eficaz para permitir la entrada de los plásmidos de ADN en las células.
- 20 En algunas realizaciones, los métodos usados en la presente invención incluyen la etapa de suministro, que comprende inyectar la vacuna de plásmido de ADN en tejido intradérmico, subcutáneo o muscular. Preferentemente, estos métodos incluyen el uso de un dispositivo de electroporación *in vivo* para preestablecer una corriente que se desea suministrar al tejido; y electroporar células del tejido con un pulso de energía a una corriente constante que es
- 25 igual a la corriente preestablecida. En algunas realizaciones, la etapa de electroporación comprende adicionalmente: medir la impedancia en las células electroporadas; ajustar el nivel de energía del pulso de energía con respecto a la impedancia medida para mantener una corriente constante en las células electroporadas; en donde las etapas de medición y ajuste se producen dentro de la duración del pulso de energía.
- 30 En algunas realizaciones, la etapa de electroporación comprende suministrar el pulso de energía a una pluralidad de electrodos de acuerdo con un patrón de secuencia de pulsos, que suministra el pulso de energía en un patrón descentralizado.
- 35 La presente divulgación también comprende fragmentos de ADN que codifican un polipéptido capaz de suscitar una respuesta inmunitaria en un mamífero, sustancialmente similar a la del no fragmentado, para al menos un subtipo de virus del dengue. Los fragmentos de ADN son fragmentos seleccionados de al menos una de las diversas secuencias de nucleótidos codificantes de la presente invención, incluyendo las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 y 5, y pueden ser cualesquiera de los siguientes fragmentos de ADN descritos, como se aplica a la secuencia de ácido nucleico codificante específica proporcionada en el presente documento. En algunas realizaciones, los fragmentos de ADN
- 40 pueden comprender 30 o más, 45 o más, 60 o más, 75 o más, 90 o más, 120 o más, 150 o más, 180 o más, 210 o más, 240 o más, 270 o más, 300 o más, 320 o más, 340 o más, o 360 o más nucleótidos. En algunas realizaciones, Los fragmentos de ADN pueden comprender secuencias codificantes para las secuencias líder de inmunoglobulina E (IgE). En algunas realizaciones, Los fragmentos de ADN pueden comprender menos de 60, menos de 75, menos de 90, menos de 120, menos de 150, menos de 180, menos de 210, menos de 240, menos de 270, menos de 300,
- 45 menos de 320, menos de 340 o menos de 360 nucleótidos. Preferentemente, los fragmentos de ADN son fragmentos de la SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5, y más preferentemente fragmentos de las SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4.
- 50 La presente divulgación incluye polipéptidos codificados por las secuencias de nucleótidos codificantes y puede incluir polipéptidos que tienen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9 o 10. La presente invención también comprende fragmentos de polipéptido que son capaces de suscitar una respuesta inmunitaria en un mamífero, sustancialmente similar a la del no fragmentado, para al menos un subtipo del dengue. Los fragmentos de polipéptido se seleccionan de al menos una de las diversas secuencias de polipéptido de la presente invención, incluyendo las SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9 y 10, y pueden ser cualesquiera de los siguientes fragmentos de polipéptido descritos, como se aplica a la secuencia de polipéptido específica proporcionada en el presente documento. En
- 55 algunas realizaciones, los fragmentos de polipéptido pueden comprender 15 o más, 30 o más, 45 o más, 60 o más, 75 o más, 90 o más, 100 o más, 110 o más, o 120 o más aminoácidos. En algunas realizaciones, los fragmentos de polipéptido pueden comprender menos de 30, menos de 45, menos de 60, menos de 75, menos de 90, menos de 100, menos de 110 o menos de 120 aminoácidos. Preferentemente, los fragmentos de polipéptido son fragmentos de las SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9 o 10, y muy preferentemente fragmentos de las SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8 o 9.
- 60 Un experto en la materia puede determinar fácilmente un fragmento funcional que suscita una respuesta inmunitaria en un mamífero sustancialmente similar a la del no fragmentado, para al menos un subtipo de dengue. El fragmento puede analizarse en cuanto a que contenga al menos uno, preferentemente más, epítomos antigénicos, proporcionados por una base de datos disponible para el público, tal como la National Center for Biotechnology Information (NCBI). Además, los estudios de respuesta inmunitaria se pueden evaluar de forma rutinaria usando
- 65 ratones y títulos de anticuerpos, y análisis por ELISpot, tal como el que muestra se a continuación en los Ejemplos.

Vacunas

5 En algunas realizaciones, la invención proporciona vacunas mejoradas proporcionando proteínas y construcciones genéticas que codifican proteínas con epítomos que las hacen particularmente eficaces como inmunógenos frente a los que pueden inducirse respuestas inmunitarias. Por consiguiente, pueden proporcionarse vacunas para inducir una respuesta inmunitaria terapéutica o profiláctica.

10 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, una vacuna de acuerdo con la invención es para su uso en la modulación de la actividad del sistema inmunitario del individuo y, de este modo, mejora la respuesta inmunitaria. Cuando una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína es captada por las células del individuo, la secuencia de nucleótidos se expresa en las células y, de este modo, la proteína se suministra al individuo.

15 De acuerdo con algunos aspectos de la invención, se proporcionan composiciones que inmunizan profiláctica y/o terapéuticamente a un individuo.

20 Cuando la célula los capta, los plásmidos de ADN pueden permanecer en la célula como material genético independiente. Como alternativa, se puede administrar ARN a la célula. Además se contempla proporcionar la construcción genética como un minicromosoma lineal que incluya un centrómero, telómeros y un origen de replicación. Las construcciones genéticas incluyen elementos reguladores necesarios para la expresión génica de una molécula de ácido nucleico. Los elementos incluyen: un promotor, un codón de iniciación, un codón de terminación y una señal de poliadenilación. Además, a menudo se precisan potenciadores para la expresión génica de la secuencia que codifica la proteína diana o la proteína inmunomoduladora. Es necesario que estos elementos estén unidos operativamente a la secuencia que codifica las proteínas deseadas y que los elementos reguladores sean operables en el individuo al que se administran.

25 Los codones de iniciación y el codón de terminación en general se consideran parte de una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína deseada. Sin embargo, es necesario que estos elementos sean funcionales en los mamíferos a los que se les administra la construcción de ácido nucleico. Los codones de iniciación y terminación deben estar en fase con la secuencia codificante.

30 Los promotores y las señales de poliadenilación utilizadas deben ser funcionales dentro de las células del individuo.

35 Los ejemplos de promotores útiles para poner en práctica la presente invención, especialmente en la producción de una vacuna genética para seres humanos, incluyen, pero sin limitación, promotores del virus de simio 40 (SV40), el promotor del virus del tumor mamario de ratón (MMTV), del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) tal como el promotor de la repetición terminal larga (LTR) del virus de la inmunodeficiencia bovina (BIV), virus de Moloney, del virus de la leucosis aviar (VLA), de citomegalovirus (CMV) tal como el promotor temprano inmediato del CMV, del virus Epstein-Barr, del virus del sarcoma de Rous (RSV) así como promotores de genes humanos tal como la actina humana, la miosina humana, la hemoglobina humana, la creatina muscular humana y la metalotioneina humana; en otras realizaciones, los promotores pueden ser promotores específicos de tejido, tales como promotores específicos de músculo o piel, naturales o sintéticos. Se describen Ejemplos de tales promotores en la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos US20040175727.

45 Los ejemplos de señales de poliadenilación útiles para poner en práctica la presente invención, especialmente en la producción de una vacuna genética para seres humanos, incluyen, pero sin limitación, las señales de poliadenilación del SV40, las señales de poliadenilación del LTR, señales de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (bGH), señales de poliadenilación de la hormona del crecimiento humana (hGH) y señales de poliadenilación de la  $\beta$ -globina humana. En particular, puede usarse la señal de poliadenilación de SV40 que está en el plásmido pCEP4 (Invitrogen, San Diego, CA), a la que se hace referencia como la señal de poliadenilación de SV40.

50 Además de los elementos reguladores necesarios para la expresión de ADN, también se pueden incluir otros elementos en la molécula de ADN. Dichos elementos adicionales incluyen potenciadores. El potenciador puede seleccionarse del grupo que incluye, pero sin limitación: potenciadores de la actina humana, la miosina humana, la hemoglobina humana, la creatina muscular humana y víricos, tales como los del CMV, el RSV y el EBV.

55 Las construcciones genéticas pueden proporcionarse con un origen de replicación de mamíferos para mantener la construcción de forma extracromosómica y producir copias múltiples de la construcción en la célula. Los plásmidos pVAX1, pCEP4 y pREP4 de Invitrogen (San Diego, CA) contienen el origen de replicación del virus Epstein Barr y la región codificante del antígeno nuclear EBNA-1, que produce replicación episómica de alta copia sin integración.

60 Para maximizar la producción de proteínas, pueden seleccionarse secuencias reguladoras que sean muy adecuadas para la expresión génica en las células a las que se administra la construcción. Además, se pueden seleccionar los codones que codifican dicha proteína que se transcriban de forma más eficaz en la célula hospedadora. Un experto en la materia puede producir construcciones de ADN que sean funcionales en las células.

65 En algunas realizaciones, pueden proporcionarse construcciones de ácido nucleico en las cuales las secuencias

codificantes para las proteínas descritas en el presente documento están unidas al péptido señal de IgE. En algunas realizaciones, las proteínas descritas en el presente documento están unidas al péptido señal de IgE.

En algunas realizaciones para las que se usa proteína, por ejemplo, un experto en la materia puede, utilizando técnicas bien conocidas, producir y aislar proteínas de la invención usando técnicas bien conocidas. En algunas realizaciones para las que se usa proteína, por ejemplo, un experto en la materia puede, utilizando técnicas bien conocidas, insertar moléculas de ADN que codifican una proteína de la invención en un vector de expresión disponible en el mercado para su uso en sistemas de expresión muy conocidos. Por ejemplo, el plásmido pSE420, disponible en el mercado (Invitrogen, San Diego, Calif.), puede usarse para la producción de proteína en *Escherichia coli* (E. coli). El plásmido pYES2 disponible en el mercado (Invitrogen, San Diego, Calif.) puede, por ejemplo, utilizarse para la producción en cepas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. El sistema de expresión de baculovirus MAXBAC™ completo disponible en el mercado (Invitrogen, San Diego, Calif.) puede, por ejemplo, usarse para la producción en células de insecto. El plásmido pcDNA o pcDNA3 disponible en el mercado (Invitrogen, San Diego, Calif.) puede, por ejemplo, utilizarse para la producción en células de mamíferos tales como células de ovario de hámster chino (CHO). Un experto en la materia puede usar estos vectores y sistemas de expresión comerciales, u otros, para producir proteínas mediante técnicas rutinarias y materiales de partida fácilmente disponibles. (Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning a Laboratory Manual*, segunda ed. Cold Spring Harbor Press (1989)). Por lo tanto, las proteínas deseadas se pueden preparar tanto en sistemas procariotas como eucariotas, dando como resultado un espectro de formas procesadas de la proteína.

Un experto en la materia puede usar otros vectores y sistemas de expresión disponibles en el mercado, o producir vectores usando métodos muy conocidos y materiales de partida fácilmente disponibles. Los sistemas de expresión que contienen las secuencias de control necesarias, tales como promotores y señales de poliadenilación, y preferentemente potenciadores, están fácilmente disponibles y son conocidos en la técnica para una diversidad de hospedadores. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning a Laboratory Manual*, segunda ed. Cold Spring Harbor Press (1989). Las construcciones genéticas incluyen la secuencia codificante de proteína unida operativamente a un promotor que es funcional en la línea celular, o células de tejido diana, en la que se transfectan las construcciones. Los ejemplos de promotores constitutivos incluyen promotores de citomegalovirus (CMV) o SV40. Los ejemplos de promotores inducibles incluyen los promotores del virus de leucemia mamaria de ratón o de metalotioneína. Los expertos en la materia pueden producir fácilmente construcciones genéticas útiles para transfectar células con ADN que codifica la proteína de la invención a partir de materiales de partida fácilmente disponibles. El vector de expresión que incluye el ADN que codifica la proteína se usa para transformar el hospedador compatible, que luego se cultiva y se mantiene en condiciones en las que tiene lugar la expresión del ADN extraño.

La proteína producida se recupera del cultivo, ya sea por lisis de las células o a partir del medio de cultivo, según sea apropiado y conocido por los expertos en la materia. Un experto en la materia puede, utilizando técnicas bien conocidas, aislar la proteína que se produce usando tales sistemas de expresión. Los métodos de purificación de proteínas a partir de fuentes naturales usando anticuerpos que se unen específicamente a una proteína específica, como se describe anteriormente, se pueden aplicar igualmente a la purificación de proteínas producidas mediante la metodología del ADN recombinante.

Además de producir proteínas mediante técnicas recombinantes, también se pueden emplear sintetizadores de péptidos automatizados para producir proteína aislada, esencialmente pura. Dichas técnicas son bien conocidas para los expertos en la materia y son útiles si los derivados tienen sustituciones no previstas en la producción de proteínas codificadas por ADN.

Las moléculas de ácido nucleico pueden suministrarse usando cualquiera de varias técnicas bien conocidas, incluyendo inyección de ADN (también denominada vacunación con ADN) con y sin electroporación *in vivo*, las mediadas por liposomas, las facilitadas por partículas, vectores recombinantes tales como adenovirus recombinantes, virus asociados a adenovirus recombinantes asociados y virus de la variolovacuna recombinantes. Preferentemente, las moléculas de ácido nucleico tales como los plásmidos de ADN descritos en el presente documento se suministran a través de inyección de ADN y junto con electroporación *in vivo*.

Las vías de administración incluyen, pero sin limitación, la intramuscular, intranasal, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea, intravenosa, intrarterial, intraocular y oral, así como tópica, transdérmica, por inhalación o supositorio, o al tejido de la mucosa, tal como por lavado, al tejido vaginal, rectal, uretral, bucal y sublingual. Las vías de administración preferentes incluyen la inyección intramuscular, intraperitoneal, intradérmica y subcutánea. Las construcciones genéticas pueden administrarse por medios que incluyen, pero sin limitación, jeringas tradicionales, dispositivos de inyección sin aguja, "pistolas de genes para el bombardeo de microproyectiles" u otros métodos físicos tales como la electroporación ("EP"), el "método hidrodinámico" o ultrasonido.

Ejemplos de dispositivos de electroporación y métodos de electroporación preferentes para facilitar la administración de las vacunas de ADN de la presente invención, incluyen los descritos en la Patente de Estados Unidos n.º 7.245.963 de Draghia-Akli, *et al.*, la publicación de patente de Estados Unidos 2005/0052630 presentada por Smith, *et al.* También son preferentes dispositivos de electroporación y métodos de electroporación para facilitar el

suministro de las vacunas de ADN proporcionadas en la Solicitud de Patente de estados Unidos en trámite y del mismo propietario, N.º de serie 11/874072, presentada 17 de octubre de 2007, que reivindica el beneficio a tenor de 35 USC 119(e) para las solicitudes provisionales con los N.º de serie 60/852.149, presentada el 17 de octubre de 2006 y 60/978.982, presentada el 10 de octubre de 2007.

5 La Patente de Estados Unidos n.º 7.245.963 de Draghia-Akli, *et al.* describe sistemas de electrodos modulares y su uso para facilitar la introducción de una biomolécula en las células de un tejido seleccionado en un cuerpo o planta. Los sistemas de electrodos modulares comprenden una pluralidad de electrodos de aguja; una aguja hipodérmica; un conector eléctrico que proporciona un enlace conductor desde un controlador de pulsos de corriente constante  
10 programable hasta la pluralidad de electrodos de aguja; y una fuente de potencia. Un operario puede sujetar la pluralidad de electrodos de aguja que están montados en una estructura de soporte e insertarlos firmemente en el tejido seleccionado en un cuerpo o planta. Después, las biomoléculas se suministran a través de la aguja hipodérmica en el tejido seleccionado. El controlador de pulsos de corriente constante programable se activa y el pulso eléctrico de corriente constante se aplica a la pluralidad de electrodos de aguja. El pulso eléctrico de corriente  
15 constante aplicado facilita la introducción de la biomolécula en la célula entre la pluralidad de electrodos.

La publicación de patente de Estados Unidos 2005/0052630 presentada por Smith, *et al.* describe un dispositivo de electroporación que puede usarse para facilitar de forma eficaz la introducción de una biomolécula en las células de un tejido seleccionado en un cuerpo o planta. El dispositivo de electroporación comprende un dispositivo electrocinético ("dispositivo EKD") cuyo funcionamiento se especifica mediante un programa informático o soporte  
20 lógico incorporado. El dispositivo EKD produce una serie de patrones de pulsos programables de corriente constante entre los electrodos de una matriz, basado en el control del usuario, y de la entrada de los parámetros del pulso, y permite el almacenamiento y la adquisición de datos en forma de onda de corriente. El dispositivo de electroporación también comprende un disco de electrodo reemplazable que tiene una matriz de electrodos de aguja, un canal de inyección central para una aguja de inyección, y un disco de guía extraíble.  
25

Las matrices de electrodos y los métodos descritos en la patente de Estados Unidos N.º 7.245.963 y la publicación de patente de Estados Unidos 2005/0052630 están adaptados para la penetración profunda no solo en tejidos tales como los músculos, sino también en otros tejidos u órganos. Debido a la configuración de la matriz de electrodos, la aguja de inyección (para suministrar la biomolécula de elección) también se inserta completamente en el órgano  
30 diana y la inyección se administra de forma perpendicular a la diana, en la zona que está predelineada por los electrodos. Los electrodos descritos en la Patente de Estados Unidos N.º 7.245.963 y la Publicación de Patente de Estados Unidos. 2005/005263 son preferentemente de 20 mm de largo y de calibre 21.

El siguiente es un ejemplo de un método en el cual pueden usarse los plásmidos de ADN de la presente invención y que se analiza con más detalle en las referencias de patentes analizadas anteriormente: los dispositivos de electroporación se pueden configurar para suministrar al tejido deseado de un mamífero un pulso de energía produciendo una corriente constante similar a una entrada de corriente preestablecida por un usuario. El dispositivo de electroporación comprende un componente de electroporación y un conjunto de electrodos o conjunto de mango.  
40 El componente de electroporación puede incluir e incorporar uno o más de los diversos elementos de los dispositivos de electroporación, incluyendo: un controlador un generador de la forma de onda de corriente, un evaluador de la impedancia, un registrador de la forma de onda, un elemento de entrada, un elemento de informe de estado, un puerto de comunicación, un componente de memoria, una fuente de alimentación y un interruptor de encendido. El componente de electroporación puede funcionar como un elemento de los dispositivos de electroporación y los otros  
45 elementos son elementos (o componentes) separados en comunicación con el componente de electroporación. En algunas realizaciones, el componente de electroporación puede funcionar como más de un elemento de los dispositivos de electroporación, que puede estar en comunicación con otros elementos de los dispositivos de electroporación separados del componente de electroporación. La presente invención no está limitada por los elementos de los  
50 dispositivos de electroporación que existen como partes de un dispositivo electromecánico o mecánico, dado que los elementos pueden funcionar como un dispositivo o como elementos separados en comunicación entre sí. El componente de electroporación tiene la capacidad de suministrar el pulso de energía que produce la corriente constante en el tejido deseado e incluye un mecanismo de retroalimentación. El conjunto de electrodos incluye una matriz de electrodos que tiene una pluralidad de electrodos en una disposición espacial, en donde el conjunto de  
55 electrodos recibe el pulso de energía procedente del componente de electroporación y lo suministra al tejido deseado a través de los electrodos. Al menos uno de la pluralidad de electrodos es neutro durante el suministro del pulso de energía y mide la impedancia en el tejido deseado, y comunica la impedancia al componente de electroporación. El mecanismo de retroalimentación puede recibir la impedancia medida y puede ajustar el pulso de energía suministrado por el componente de electroporación, para mantener la corriente constante.  
60

En algunas realizaciones, la pluralidad de electrodos puede suministrar el pulso de energía en un patrón descentralizado. En algunas realizaciones, la pluralidad de electrodos puede suministrar el pulso de energía en el patrón descentralizado a través del control de los electrodos bajo una secuencia programada, y un usuario introduce la secuencia programada en el componente de electroporación. En algunas realizaciones, la secuencia programada  
65 comprende una pluralidad de pulsos suministrados en secuencia, en donde al menos dos electrodos activos suministran cada pulso de la pluralidad de pulsos, con un electrodo neutro que mide la impedancia, y en donde un

pulso posterior de la pluralidad de pulsos es suministrado por uno distinto de al menos dos electrodos activos, con un electrodo neutro que mide la impedancia.

En algunas realizaciones, el mecanismo de retroalimentación es realizado por un hardware o un programa informático. Preferentemente, el mecanismo de retroalimentación se realiza mediante un circuito analógico de bucle cerrado. Preferentemente, la retroalimentación se produce cada 50  $\mu$ s, 20  $\mu$ s, 10  $\mu$ s o 1  $\mu$ s, pero preferentemente es una realimentación en tiempo real o instantánea (es decir, sustancialmente instantánea como se determina por las técnicas disponibles para determinar el tiempo de respuesta). En algunas realizaciones, el electrodo neutro mide la impedancia en el tejido deseado y comunica la impedancia al mecanismo de retroalimentación, y el mecanismo de retroalimentación responde a la impedancia y ajusta el pulso de energía para mantener la corriente constante en un valor similar a la corriente preestablecida. En algunas realizaciones, el mecanismo de retroalimentación mantiene la corriente constante de forma continua e instantánea durante el suministro del pulso de energía.

Un excipiente farmacéuticamente aceptable puede incluir moléculas funcionales tales como vehículos, adyuvantes, transportadores o diluyentes, que son conocidos y están fácilmente disponibles para el público. Preferentemente, el excipiente farmacéuticamente aceptable es un adyuvante o agente que facilita la transfección. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico o plásmido de ADN, se administra a las células junto con la administración de un potenciador de función del polinucleótido o un agente que facilita vacunas genéticas (o agente facilitador de la transfección). Los potenciadores de la función de polinucleótidos se describen en los documentos número de serie de Estados Unidos 5.593.972, 5.962.428 y la solicitud internacional número de serie PCT/US94/00899 presentada el 26 de enero de 1994. Los agentes facilitadores de vacunas genéticas se describen en el documento de Estados Unidos Número de serie 021.579 presentado el 1 de abril de 1994. El agente que facilita la transfección puede administrarse junto con moléculas de ácido nucleico como una mezcla con la molécula de ácido nucleico o administrarse por separado de forma simultánea, antes o después de la administración de moléculas de ácido nucleico. Los ejemplos de agentes que facilitan la transfección incluyen agentes tensioactivos tales como complejos inmunoestimulantes (ISCOMS), adyuvante incompleto de Freund, un análogo de LPS incluyendo monofosforil lípido A, muramil péptidos, análogos de quinona y vesículas tales como escualeno y escualeno, y también se puede usar ácido hialurónico administrado junto con la construcción genética. En algunas realizaciones, las vacunas de plásmido de ADN también pueden incluir un agente que facilita la transfección tal como lípidos, liposomas, incluyendo liposomas de lecitina u otros liposomas conocidos en la técnica, como una mezcla de ADN-liposoma (véase, por ejemplo, el documento WO9324640), iones de calcio, proteínas víricas, polianiones, policationes o nanopartículas, u otros agentes que facilitan la transfección. Preferentemente, el agente que facilita la transfección es un polianión, un polication, incluyendo poli-L-glutamato (LGS) o un lípido.

En algunas realizaciones preferentes, los plásmidos de ADN se suministran con un adyuvante que son genes de proteínas que potencian aún más la respuesta inmunitaria frente a tales proteínas diana. Los ejemplos de tales genes son los que codifican otras citocinas y linfocinas, tales como interferón alfa, interferón gamma, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , GM-CSF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, MHC, CD80, CD86 e IL-15, incluyendo IL-15 que tiene la secuencia señal delecionada e incluyendo opcionalmente el péptido señal de IgE. Otros genes que pueden ser útiles incluyen los que codifican: MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1  $\beta$ , IL-8, RANTES, L-selectina, P-selectina, E-selectina, CD34, GlyCAM-1, MadCAM-1, LFA-1, VLA-1, Mac-1, p150.95, PECAM, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, CD2, LFA-3, M-CSF, G-CSF, IL-4, formas mutantes de IL-18, CD40, CD40L, factor de crecimiento vascular, el factor de crecimiento de fibroblastos, IL-7, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento endotelial vascular, Fas, receptor de TNF, Fit, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, Caspasa ICE, Fos, c-jun, Sp-1, Ap-1, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, I $\kappa$ B, NIK inactiva, SAP K, SAP-1, JNK, genes de respuesta al interferón, NF $\kappa$ B, Bax, TRAIL, TRAILrec, TRAILrecDRC5, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, LIGANDO DE RANK, Ox40, LIGANDO DE Ox40, NKG2D, MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAP1, TAP2 y fragmentos funcionales de los mismos.

Las vacunas de plásmido de ADN de acuerdo con la presente invención comprenden cantidades de ADN de aproximadamente 1 nanogramo a 10 miligramos; aproximadamente 1 microgramo a aproximadamente 10 miligramos; o preferentemente de aproximadamente 0,1 microgramos a aproximadamente 10 miligramos; o más preferentemente de aproximadamente 100 microgramos a aproximadamente 1 miligramos. En algunas realizaciones preferentes, Las vacunas de plásmido de ADN de acuerdo con la presente invención comprenden de aproximadamente 5 nanogramos a aproximadamente 1000 microgramos de ADN. En algunas realizaciones preferentes, las vacunas de plásmido de ADN contienen aproximadamente de 10 nanogramos a aproximadamente 800 microgramos de ADN. En algunas realizaciones preferentes, las vacunas de plásmido de ADN contienen aproximadamente de 0,1 a aproximadamente 500 microgramos de ADN. En algunas realizaciones preferentes, las vacunas de plásmido de ADN contienen aproximadamente de 1 a aproximadamente 350 microgramos de ADN. En algunas realizaciones preferentes, las vacunas de plásmido de ADN contienen aproximadamente de 25 a aproximadamente 250 microgramos de ADN. En algunas realizaciones preferentes, las vacunas de plásmido de ADN contienen aproximadamente de 100 microgramos a aproximadamente 1 miligramo de ADN.

Las vacunas de plásmido de ADN de acuerdo con la presente invención se formulan de acuerdo con el modo de administración a utilizar. En los casos en que las vacunas de plásmido de ADN sean composiciones inyectables, son

estéres y/o sin pirógenos y/o sin partículas. Se usa preferentemente una formulación isotónica. En general, los aditivos para la isotonicidad pueden incluir cloruro de sodio, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa. En algunos casos, son preferentes soluciones isotónicas tales como solución salina tamponada con fosfato. Los estabilizadores incluyen gelatina o albúmina. En algunas realizaciones, se añade a la formulación un agente para la vasoconstricción. En algunas realizaciones, se añade a la formulación un agente estabilizante que permite que la formulación sea estable a temperatura normal o ambiente durante períodos de tiempo prolongados, tales como LGS u otros policationes o polianiones.

En algunas realizaciones, Los métodos para suscitar una respuesta inmunitaria en mamíferos frente a un antígeno consenso del dengue incluyen métodos para inducir respuestas inmunitaria de la mucosa. Dichos métodos incluyen administrar al mamífero una o más proteína CTACK, proteína TECK, proteína MEC y fragmentos funcionales de las mismas, o secuencias codificantes expresables de las mismas en combinación con un plásmido de ADN que incluye un antígeno consenso del dengue, descrito anteriormente. La una o más de las proteínas CTACK, proteína TECK, proteína MEC y fragmentos funcionales de las mismas pueden administrarse antes de, de forma simultánea o después de la administración de las vacunas para el dengue de plásmido de ADN proporcionadas en el presente documento. En algunas realizaciones, se administra al mamífero una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una o más proteínas seleccionadas del grupo que consiste en: CTACK, TECK, MEC y fragmentos funcionales de las mismas.

## Ejemplos

La presente invención se ilustra adicionalmente en los siguientes Ejemplos. Debe entenderse que estos Ejemplos, si bien indican realizaciones preferentes de la invención, se proporcionan solo a modo de ilustración. A partir del análisis anterior y de estos Ejemplos, un experto en la técnica puede determinar las características esenciales de la presente invención y, sin apartarse del espíritu y del alcance de la misma, puede realizar diversos cambios y modificaciones de la invención para adaptarla a diversos el uso y condiciones. Por lo tanto, gracias a la descripción anterior, para los expertos en la materia serán evidentes diversas modificaciones de la invención, más allá de las mostradas y descritas en el presente documento. También se pretenden que dichas modificaciones estén dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Preferentemente, las formulaciones de ADN para su uso con un dispositivo de EP de músculo o piel descrito en el presente documento tienen altas concentraciones de ADN, preferentemente concentraciones que incluyen microgramos a cantidades de decenas de miligramos, y preferentemente cantidades en miligramos de ADN en pequeños volúmenes que son óptimos para el suministro a la piel, preferentemente un pequeño volumen de inyección, idealmente 25-200 microlitros ( $\mu$ l). En algunas realizaciones, las formulaciones de ADN tienen altas concentraciones de ADN, tales como 1 mg/ml o más (mg de ADN/volumen de formulación). Más preferentemente, la formulación de ADN tiene una concentración de ADN que proporciona cantidades en gramos de ADN en 200  $\mu$ l de fórmula, y más preferentemente cantidades en gramos de ADN en 100  $\mu$ l de fórmula.

Los plásmidos de ADN para su uso con los dispositivos de EP de la presente invención se pueden formular o fabricar usando una combinación de dispositivos y técnicas conocidos, pero preferentemente se fabrican usando una técnica optimizada de fabricación de plásmidos que se describe en la solicitud de Estados Unidos 12/126611, que se publicó como Publicación de Estados Unidos N.º 20090004716, que se publicó el 1 de enero de 2009. En algunos ejemplos, los plásmidos de ADN utilizados en estos estudios pueden formularse a concentraciones mayores o iguales que 10 mg/ml. Las técnicas de fabricación también incluyen o incorporan diversos dispositivos y protocolos que son habitualmente conocidos por los expertos en la materia, además de los descritos en la Publicación de Estados Unidos N.º 20090004716 y los descritos en la Patente de Estados Unidos N.º 7.238.522, que se presentó el 3 de julio de 2007. Las altas concentraciones de plásmidos usadas con los dispositivos de EP de piel y las técnicas de administración descritas en el presente documento permiten la administración de plásmidos en el espacio i.d/s.c. en un volumen razonablemente bajo y ayudan a potenciar la expresión y los efectos de inmunización.

### EJEMPLO 1: CONSTRUCCIONES PARA LA EXPRESIÓN DE DIII DEL DENGUE

Se recogieron aproximadamente 15 secuencias de subtipos de distintas poblaciones geográficas procedentes del GeneBank, para evitar el sesgo de muestreo. Todas las secuencias usadas eran no recombinantes. Se llevó a cabo el alineamiento múltiple de las secuencias de DIII de la envoltura de Dengue (E de Dengue) utilizando la aplicación Clustal X (versión 1.81), en la cual los parámetros de alineamiento por bases pares se establecieron en la programación dinámica de precisión- lenta, utilizando 10 como penalización de apertura de hueco y 0,1 como la penalización de extensión de hueco. Los parámetros de alineamiento múltiple incluyen una penalización de extensión de hueco espacio igual a 0,2. La secuencia de nucleótidos consenso de E de Dengue se obtuvo después de realizar un alineamiento múltiple y algunos ajustes manuales menores. Se usaron secuencias de aminoácidos deducidas para guiar la introducción de huecos de alineamiento, de forma que estaban insertados entre codones. La optimización de codones y la optimización de ARN se realizó mediante el uso de GeneOptimizer (GENEART, Alemania). La secuencia sintética con codones optimizados se clonó adicionalmente en los sitios KpnI/PstI del plásmido de expresión en mamífero pVAX.

La Figura 1 ilustra la organización del polipéptido de Dengue y las características conformacionales de E de Dengue E. E de Dengue consiste en tres dominios distintos: I, II y III. Las secuencias de aminoácidos del dominio DIII de E de Dengue se escogieron de la base de datos NCBI y se alinearon para generar una secuencia consenso: DIII de DV-1 (SEQ ID NO: 1), DIII de DV-2 (SEQ ID NO: 2), DIII de DV-3 (SEQ ID NO: 3 y DIII de DV-4 con la (SEQ ID NO: 4). Las secuencias de aminoácidos de distintas cepas se ensamblaron para el alineamiento utilizando Lasergene 7 (DNA Star Inc, Madison, WI). Se fusionó al extremo N de la secuencia codificante una secuencia líder de Ig-E, precedida por una secuencia de Kozak. Basándose en la secuencia de aminoácidos, se creó la secuencia sintética optimizada del gen humano utilizando herramientas de programas informáticos de Genearth Inc y se clonó en el vector pVAX. Los vectores de expresión que codifican los dominios DIII de la envoltura de Dengue de los subtipos 1, 2, 3 y 4 se denominaron pDV-1 DIII, pDV-2 DIII, pDV-3 DIII y pDV-4 DIII, respectivamente. Los mapas plasmídicos se proporcionan en la Fig. 4a.

Se construyó una construcción que combina los cuatro dominios DIII (DIII universal o universal) separados por secuencias de escisión proteolítica y se denominó DV-U-DIII (SEQ ID NO: 5). La Figura 3 muestra el esquema de la organización de la fase de lectura abierta, así como la secuencia de aminoácidos sobre la cual se basó la síntesis del gen humano optimizado. DV-U-DIII se clonó en el vector pVAX para crear una construcción de expresión universal: pDV-U-DIII, cuyo mapa plasmídico puede observarse en la Fig. 4b.

## EJEMPLO 2

Expresión del dominio DIII de Dengue en el sistema de mamífero

Las células C6/36 de *Aedes albopictus*, las células Vero, HEK293, HeLa, y las RD y BHK se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (Manassas, VA). Las células C6/36 se mantuvieron en medio esencial mínimo Eagle (EMEM; Gibco BRL) complementado con suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor al 10 %, penicilina G (100 U/ml), estreptomycin (100 ug/ml), L-glutamina y aminoácidos no esenciales a 28 °C en CO<sub>2</sub> al 5 %. Las células Vero se mantuvieron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM)-F12 (Gibco BRL) que contenía tampón HEPES 115 mM complementado con suero fetal bovino inactivado por calor al 10 %, penicilina G (100 U/ml), estreptomycin (100 ug/ml), L-glutamina y aminoácidos no esenciales a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 %. HEK293, Las células HeLa y RD se mantuvieron en medio DMEM complementado con suero fetal bovino inactivado por calor al 10 %, penicilina G (100 U/ml), estreptomycin (100 ug/ml) a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 %.

Los virus utilizados incluyeron el virus DENV 1, el DENV 2, el prototipo DENV 3 (cepa H 87) y el prototipo DENV 4 (H241). Todos los experimentos con el virus del Dengue utilizaron aislados de virus clínicos y reservas que se habían pasado en cultivo celular menos de cuatro veces. Las reservas de virus se obtuvieron inoculando una monocapa de células C6/36 en un matraz de cultivo de tejidos de 75 cm<sup>2</sup> con 200 µl de virus diluido en 1 ml de EMEM-SFB al 2%. Después de una hora, se añadieron 14 ml de EMEM complementado con SFB al 2 % y las células se cultivaron durante 10 días a 28 °C en CO<sub>2</sub> al 5 %. El sobrenadante se retiró de las células y se centrifugó durante 5 min a 2000 X g para sedimentar los restos celulares. El sobrenadante se alícuotó y se reservó a 80 °C. El DENV 1 se cultivó y pasó en células Vero, mientras que DENV 4 (H241) se cultivó en células C6/36 como se describe anteriormente y se pasó una vez en células Vero.

Para detectar la presencia de transcritos ARNm que codifican los dominios DIII se utilizó el método de RT-PCR, ya que las construcciones de vacuna para DIII de Dengue basadas en pVAX no incluyen epítopos sintéticos adicionales. Se transfeció una línea celular de rhabdomyosarcoma humana, las células RD, con las construcciones de expresión de DIII (independientemente con cada uno de los cuatro serotipos y el universal) y dos días después de la transfección, se preparó el ARN total a partir de las células transfectadas. Usando cebadores específicos para cada uno de los serotipos del virus del Dengue, se llevó a cabo RT-PCR para amplificar los dominios DIII respectivos. La Figura 5 es una foto de un gel que muestra los fragmentos de DIII amplificados a partir de las células transfectadas, representados por las bandas que representan fragmentos de 360 pb de longitud. Las células transfectadas de forma simulada (transfectadas con el vector pVAX vacío) no mostraron tales productos amplificados. Este estudio confirma la presencia de transcritos ARNm para la expresión de DIII a partir de células transfectadas. Por lo tanto, estas construcciones de ADN sugieren la expresión de productos proteicos.

Además de estas construcciones de ADN basadas en pVAX, se construyó un conjunto adicional de construcciones de ADN para expresar productos proteicos similares. Estas construcciones incluyen una fusión del dominio DIII del virus del Dengue y un epítipo FLAG sintético (Sigma Co.) para fines de inmunodetección (denominadas construcciones FLAGGED). Las células RD se transfectaron con las construcciones FLAGGED y treinta y seis horas después de la transfección, las células se analizaron con un ensayo de inmunofluorescencia usando un anticuerpo monoclonal anti-FLAG (Sigma Co.).

El patrón de expresión para los cuatro dominios DIII, de forma individual, y el dominio DIII combinado, o DIII universal (o antígeno universal del dengue), a partir de pDV-U-DIII, fue idéntico, como se evidenció a partir del patrón de localización citoplásmica de la proteína (véase Figura 6). Varios informes han documentado bien que la expresión de E de Dengue de longitud completa produce un patrón citoplasmático típico. Por lo tanto, la expresión de DIII, sola, concuerda con el de E de Dengue E de longitud completa. Se generaron proteínas DIII de E de Dengue

radiomarcadas a partir de estas construcciones FLAGGED y se resolvieron en un gel de SDS-PAGE. La movilidad de estas proteínas corresponde a una proteína con una masa de alrededor de 16 kDa, como se muestra en la foto del gel de la Figura 7. La masa molecular de los dominios DIII combinados parecía ser una masa de aproximadamente 50 kDa.

5 EJEMPLO 3  
Síntesis y producción de la proteína DIII de E del DENV de los cuatro subtipos utilizando un sistema de expresión y purificación bacteriano:

10 La región de envoltura (295-415) que representa el dominio DIII de los cuatro serotipos del Dengue se expresó en *E. coli* mediante transformación con un vector pQE que incluye un dominio DIII codificante. Los tamaños predichos de DIII de E de Dengue son de aproximadamente 16 kDa. La SDS-PAGE (electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida) de los lisados bacterianos mostró proteínas sobreexpresadas del tamaño esperado en cultivos de *E. coli* inducidos con IPTG (isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido). El IPTG se usa comúnmente como un mimético molecular de alolactosa para inducir la actividad de la beta-lactosidasa. Además, la apariencia de la banda proteica que aparece en la fracción eluida de la columna de Ni (columna quelada con Ni con la capacidad de unirse a proteínas recombinantes etiquetadas con polihistidina) corresponde a la movilidad de la banda prominente que aparece en la columna con lisados tratados con IPTG. Los lisados de muestras transformadas con vector pQE tanto de muestras no tratadas como tratadas con IPTG (Figura 8, primeros dos carriles) no pudieron mostrar la banda proteica que corresponde a los dominios DIII. Este resultado confirma que las proteínas purificadas son los dominios DIII del Dengue expresados a partir de construcciones de expresión del vector pQE, tras la inducción con IPTG (Figura 8).

25 EJEMPLO 4  
Inmunización de ratones a través de EP (usando CELLECTRA) con el candidato de vacuna pDV-U-DIII y la especificidad de los sueros de DV-U-DIII frente a los dominios DIII:

30 Los ratones se inmunizaron con las construcciones de ADN de plásmido (como se describe anteriormente en el Ejemplo 1) de acuerdo con la pauta ilustrada en la Figura 9.

35 Se inmunizaron grupos (n=4) de ratones Balb/c de 4 semanas de edad por vía intramuscular con 15  $\mu$ g pDV-U-DIII y con los vectores que expresan DIII individuales restantes. pVAX se usó como vector de control. Antes de la inmunización, se recogieron muestras de sangre de los ratones preinmunizados utilizando protocolos establecidos para el sangrado a través de las venas del ojo. En todos los experimentos se usaron pulsos de onda cuadrada (Draghia-Akli y Smith, 2003) y se suministraron con el electroporador CELLECTRA® de corriente constante (VGX Pharmaceuticals, Blue Bell, PA). En los experimentos con ratones se utilizó una matriz de tres electrodos (3-EA, forma siglada de *three electrode array*). La 3-EA consiste en tres electrodos de acero inoxidable sólidos de calibre 26 en una formación en triángulo isósceles, entando los dos lados largos de 0,5 mm de longitud y el lado corto de 0,3 mm de longitud, unidos por un plástico no conductor. Para las condiciones específicas de la EP para los experimentos en ratón se usó corriente constante, 0,1 A, tres pulsos, 52 ms/pulso, 4 s entre pulsos. El tiempo de retraso entre la inyección del plásmido y la EP fue de aproximadamente 20 s.

45 La secuencia de sucesos para la administración/EP del plásmido se realizó de la siguiente manera: un conjunto de electrodos desechable se colocó en el receptáculo del mango, se presionó el botón de iniciación en el mango, se introdujo el número de grupo experimental de animales, se inyectaron 50  $\mu$ l de plásmido de la construcción de ADN (15  $\mu$ g de ADN total) usando una jeringa de insulina, se colocaron inmediatamente la agujas en el área que rodea el sitio de inyección, el botón de iniciación del mango y después de 4 segundos de cuenta regresiva, se suministraron los pulsos. Tras 5 segundos después de la electroporación, la matriz se retiró del músculo suavemente. Todos los electrodos se insertaron completamente en el músculo durante todos los tratamientos. Todo el ADN se preparó usando columnas de Qiagen sin endotoxinas. Los animales se alojaron en una instalación con temperatura controlada y ciclos de luz en la Universidad de Pensilvania, y su cuidado se realizó bajo las directrices de los Institutos Nacionales de Salud y la Universidad de Pensilvania.

55 Las muestras de suero de ratones individuales obtenidas después del tercer refuerzo se analizaron en cuanto a títulos de anticuerpos anti DENV mediante ELISA. Todos los ratones produjeron anticuerpos anti-DIII. Los títulos de anticuerpos anti-DIII de D de DENV generados por los ratones inmunizados se determinaron mediante ensayo ELISA, usando fragmentos de DIII purificados como antígenos de captura. Los antígenos se capturaron en placas de ELISA recubiertas de Ni y luego se analizaron frente a los sueros de los ratones vacunados con pDV-U-DIII. Tal y como se muestra en las figuras 10, los sueros de los ratones inmunizados con pDV-U-DIII presentaron altos niveles de reactividad por ELISA, mientras que la reactividad del suero de los ratones inmunizados con pVAX era insignificante (datos no mostrados). Además hubo una gran diferencia entre los ratones pre- y posvacunados con pDV-U-DIII, en términos de la generación de anticuerpos anti-dominio DIII. El nivel de títulos de anticuerpos generados por las construcciones de expresión del dominio DIII individuales fue significativamente menor que el título de anticuerpos suscitado por el candidato de vacuna pDV-U-DIII. Basándose en estos datos de ELISA, los inventores decidieron proceder con el suero anti-DIII recogido de los ratones inmunizados con el candidato de

vacuna pDV-U-DIII para todos los análisis posteriores.

Se examinó la capacidad de los sueros recogidos de los ratones inmunizados con la construcción pDV-U-DIII de reaccionar con los dominios DIII de los cuatro serotipos. Los lisados bacterianos inducidos con IPTG, así como los dominios DIII purificados de los cuatro serotipos, se resolvieron en un gel SDS-PAGE y se inmunosondaron mediante análisis de transferencia de western, usando el suero de pDV-U-DIII como posible suero anti-DIII del Dengue. Se utilizó un anticuerpo anti-ratón conjugado con HRP para detectar el complejo antígeno-anticuerpo, y se utilizó un sistema quimioluminiscente para detectar inmunorreacción. El suero D-U reconoció claramente las proteínas DIII procedente tanto de los lisados inducidos con IPTG como de las muestras eluidas con Ni para los cuatro serotipos. La unión específica al antígeno DIII sin unirse a otras muestras de proteínas del lisado sin procesar arroja la evidencia directa de la reacción específica entre el suero y el antígeno DIII (véase la banda resuelta, incluyendo las bandas del multímero, en la Figura 11). El suero identificó una molécula de una masa de aproximadamente 16 kDa, lo que es equivalente a la masa presentada por los fragmentos de DIII purificados.

Además, se examinó el suero frente a DV-U-DIII para verificar si se puede unir a los antígenos de DIII expresados en células que se transfectaron de forma individual con los cuatro dominios DIII. Para este fin, las células HeLa se transfectaron transitoriamente con estas construcciones de expresión pVAX que codifican DIII y treinta y seis horas postransfección, las células se fijaron para el análisis por inmunofluorescencia.

En primer lugar, las células se transfectaron con construcciones de vacuna frente al Dengue y pVAX (1 mg/pocillo) utilizando FuGENE 6 Transfection Reagent (Roche). Después de incubar durante 90 minutos las células transfectadas con anticuerpo anti-Dengue de ratón o con los sueros de los ratones vacunados con pDV-U DIII, los portaobjetos se incubaron durante 45 min con anticuerpo secundario conjugado con isotiocianato de tetrametil rodamina (Sigma-Aldrich). Se añadió clorhidrato de 40,6-diamido-2-fenilindol (Sigma-Aldrich) a la solución del anticuerpo secundario para contrateñir los núcleos, para mostrar los núcleos del número total de células disponibles en un campo dado. Las imágenes se analizaron usando el programa Phase 3 Pro para microscopía fluorescente (Media Cybernetics, Silver Spring, MD).

El suero anti-DV-U-DIII no produjo ninguna tinción significativa tanto con células HeLa transfectadas con pVAX como sin transfectar (recibidas de la ATCC, Va). Sin embargo, El suero frente a DV-U-DIII produjo una tinción altamente específica con los antígenos DIII solos (Figura 12). Lo que es más importante, las células que expresan DIII revelaron de forma predominante un patrón de localización citoplásmica. Esta observación concuerda con los estudios de inmunofluorescencia llevados a cabo con vectores de expresión de DIII etiquetados con epítipo FLAG, usando anticuerpo anti-FLAG que se dirige a las proteínas DIII fusionadas con el epítipo FLAG, como se muestra en la Figura 6.

#### EJEMPLO 5:

Unión de sueros anti-DIII de ratones vacunados con pDV-U-DIII al dominio DIII intacto de E de viriones vivos con una conformación natural:

El suero frente a DV-U DIII se analizó frente a las células infectadas con Dengue 2 para ver si el suero anti-DIII podría reaccionar con los virus del Dengue 2. Naturalmente, se cree que los dominios DIII están situados en la región de pico de la configuración tridimensional del Dengue E en la superficie externa de los virus.

El virus del Dengue 2 se amplificó en células BHK-21 (línea celular de riñón de hámster bebé; ATCC, Manassas, Va) para lograr altos títulos. Además, este reserva de virus de alto título se utilizó para infectar células Vero (ATCC, Manassas, Va). Después de cuatro días de infección, las células infectadas con Dengue 2 se tiñeron con suero anti-DV-U DIII, seguido de anticuerpo anti-ratón conjugado con FITC, según los protocolos descritos en el Ejemplo 4 anterior. El suero anti-DV-U DIII no produjo ningún patrón de tinción distinto con las células no infectadas. Este suero reaccionó solo con las células infectadas con los virus Dengue del subtipo 2. El suero recogido de ratones vacunados con pVAX tampoco reaccionó con células Vero tanto infectadas como no infectadas con Dengue 2. Por lo tanto, solo los ratones vacunados con DV-U-DIII generaron anticuerpos anti-DIII que pueden reconocer los dominios DIII de E del Dengue (Figura 13).

El suero frente a DV-U DIII se analizó frente a las células infectadas con los cuatro subtipos del Dengue para ver si el suero anti-DIII podría reaccionar con los cuatro tipos de células infectadas.

Las células Vero cultivadas durante una noche en portaobjetos con cámaras se infectaron con reservas de virus de alto título de los cuatro subtipos. Después de cuatro días de infección, las células infectadas con Dengue se tiñeron con suero anti-DV-U DIII, seguido de anticuerpo anti-ratón conjugado con FITC, según los protocolos descritos anteriormente. El suero anti-DV-U DIII no produjo ningún patrón de tinción distinto con las células no infectadas. Este suero reaccionó solo con las células infectadas con subtipos del Dengue. Curiosamente, el suero recogido de los ratones vacunados con pVAX tampoco reaccionó con las células Vero tanto infectadas como no infectadas con Dengue. Por lo tanto, solo los ratones vacunados con DV-U DIII generaron anticuerpos anti-DIII que pueden reconocer los dominios DIII de E de los viriones de Dengue (Figura 15). El panel superior indica las células

infectadas y el panel inferior muestra el mismo campo con tinción DAPI para indicar el contenido nuclear de las células disponibles en el campo. Esta observación no solo indica la interacción específica entre el anticuerpo anti-DIII presente en los ratones vacunados DV-U DIII y el antígeno DIII, sino que también indica que este anticuerpo puede reaccionar al dominio DIII intacto de E del propio virus del Dengue en la conformación natural.

5

## EJEMPLO 6:

Capacidad neutralizante del suero anti-DIII frente a diversos subtipos del virus del Dengue:

10 La capacidad neutralizante de los sueros generados frente al pDV-U DIII o sueros preinmunizados (control) sobre la infectividad DENV1, 2, -3 y -4 se determinó usando el ensayo de neutralización de placas. Las pruebas de neutralización por reducción de placas se realizaron utilizando los protocolos modificados de Russel *et al.* (A Plaque Reduction Test for Dengue Virus Neutralizing Antibodies. 1967. pág. 285-290), Kochel, T.J., *et al.* (Effect of dengue-1 antibodies on American dengue-2 viral infection and dengue haemorrhagic fever. The Lancet, 2002. 360(9329): pág. 310-312) y Wu, S.-J.L., *et al.* (Detection of Dengue Viral RNA Using a Nucleic Acid Sequence-Based Amplification Assay. 2001. pág. 2794-2798).

15

Se mezclaron las reservas de virus y distintas diluciones de suero anti-DIII de los ratones vacunados con pDV-U-DIII, y la mezcla resultante se completó hasta 200 microlitros con medio D10 (medio DMEM complementado con suero fetal bovino al 10 %; Invitrogen) en tubos Eppendorf. Estas mezclas se mantuvieron en la incubadora a 37 °C durante una hora y después se añadieron a las células (las células se sembraron durante una noche en portaobjetos con cámaras para cultivo de tejidos), para permitir la infección de las células Vero. Después de una hora de incubación con las mezclas de virus, las células se lavaron exhaustivamente con PBS y se dejaron en la cámara de incubación para una incubación adicional con medios celulares, durante cuatro días. Los controles para este ensayo incluían: (1) células Vero no infectadas, (2) células infectadas con reserva de virus y no tratadas con nada de suero y (3) células infectadas con reservas de virus y tratadas con suero de los ratones vacunados con pVAX.

20

El suero anti-DIII de los ratones vacunados con pDV-U-DIII tiñó las células infectadas con Dengue 2 sin ninguna ambigüedad (Fig. 13). Además, el suero no produjo ninguna tinción significativa con las células no infectadas. El mayor número de células infectadas por tinción se observó con las reservas de virus que no se habían tratado con ningún suero. Se descubrió que el número de células infectadas con virus se redujo en las células que se infectaron con reservas de virus tratadas con sueros anti-DIII, en comparación con las células que recibieron reservas de virus no tratadas. Por lo tanto, el tratamiento de las reservas de virus con los sueros anti DIII redujo el título del virus Dengue 2, como se observa en el gráfico de barras que se muestra en la Fig. 14.

25

Se lograron resultados de neutralización similares utilizando reservas de virus de los subtipos Dengue 1, 3 y 4, en lugar de con la reserva de virus Dengue 2, utilizada anteriormente. El suero anti-DIII de ratones vacunados con p-DV-U DIII tiñó las células infectadas con los cuatro subtipos de Dengue sin ninguna ambigüedad. Además, se observó que el suero no produjo ninguna tinción significativa con las células no infectadas. El mayor número de células infectadas por tinción se observó con las reservas de virus que no se habían tratado con ningún suero. Se descubrió que el número de células infectadas era significativamente menor en las células que se habían tratado con reservas de virus tratadas con sueros anti-DIII, que en las células que recibieron reservas de virus no tratadas. Por lo tanto, el tratamiento de las reservas de virus con los sueros anti DIII redujo el título de los viriones infecciosos de Dengue. Por lo tanto, los sueros de los ratones vacunados con pDV-U DIII contenían anticuerpos anti-DIII que mostraron capacidad neutralizante frente a los cuatro subtipos de dengue.

30

Además, se analizó el efecto neutralizante del suero de pDV-U DIII para determinar su impacto sobre los efectos citopáticos provocados por las infecciones con dengue. La Figura 16 muestra los datos de neutralización generados (Datos del Southern Research Institute, Frederick, MD) usando los sueros frente a DV-U DIII con diversos subtipos de Dengue. Esta figura indica que el suero frente a DV-U DIII tiene la capacidad de neutralizar los cuatro subtipos de virus del Dengue hasta el factor de dilución de 1:1100. El suero recogido de los ratones vacunados con pVAX no neutralizó ninguno de los subtipos del virus Dengue.

35

## EJEMPLO 7

40

Activación de linfocitos B frente a antígenos de DIII de E del Dengue

Se prepararon bazos de ratones vacunados con DIII-DNA para medir la frecuencia de los linfocitos B capaces de producir anticuerpos dirigidos frente a proteínas DIII.

45

La suspensión de proteína del Dengue se descongeló y el tubo se sometió a agitación vorticial para resuspender las finas partículas de proteína. Se disolvieron alícuotas pequeñas de la proteína resuspendida en tampón TU (Tris-HCl 62 mM/urea 8M, pH 8,0) para producir una solución de 10 ug/ml. Las proteínas del Dengue eran solubles en este tampón. Se aplicaron alícuotas de 100 ul (1 ug) de proteína diluida a los pocillos de una placa de alta capacidad de unión recubierta con cobre HisGrab de Pierce y estas placas de Ni recubiertas con antígeno se analizaron adicionalmente según protocolos de rutina (Yan, J., *et al.*, Enhanced Cellular Immune Responses Elicited by an

50

55

Engineered HIV-1 Subtype B Consensus-based Envelope DNA Vaccine. Mol Ther. 15(2): págs. 411-421). El mismo protocolo se aplicará en estudios futuros que impliquen modelos de ratones y monos. Para los ensayos de ELISpot para IFN-gamma, se usarán estimulantes antigénicos péptidos de 15 meros con 10 aminoácidos solapantes que abarcan las regiones DIII de los cuatro serotipos como. Estos ensayos se realizarán a partir de las células recogidas de los bazo de los ratones expuestos así como de sujetos mono.

Los resultados del ensayo ELISpot coinciden con los datos de ELISA para el anticuerpo DIII que se describen anteriormente. Se observaron frecuencias más altas de células secretoras de anticuerpos de ratón específicas para DIII en los ratones vacunados con pDV-U DIII que en los grupos que recibieron el dominio DIII individual solo (Fig. 17). En conjunto, los resultados de ELISpot indicaron la activación de linfocitos B específicos de antígeno de alta afinidad que correspondían a los títulos de anticuerpos específicos de DIII, como se determinó por los estudios ELISA.

EJEMPLO 7:

Generación de anticuerpos neutralizantes del Dengue en macacos de la India:

Los macacos de la India pueden vacunarse con la construcción pDV-U-DIII que expresa Dengue. Después de tres refuerzos se puede evaluar el título de anticuerpos y los monos se pueden exponer a los cuatro serotipos del virus del Dengue.

Los macacos de la India se aclimatan durante 2 meses antes del inicio de los experimentos. El estudio puede desarrollarse de la siguiente manera: Semana 0 - se realizó la primera inmunización (administración de dosis de plásmido) y el sangrado inicial; Semana 2, se realizó sangrado; Semana 3, se realizó la 2ª inmunización (administración de dosis de plásmido); Semana 5, se realizó sangrado; Semana 6, se realizó la 3ª inmunización (administración de dosis de plásmido) y sangrado; Semana 8, se realizó sangrado.

Los sujetos se inmunizan por vía intramuscular con la formulación de pDV-U DIII a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml (y preferentemente de aproximadamente 10 mg/ml) y con los vectores restantes que expresan los DIII individuales. pVAX puede usarse como vector de control. Los pulsos de onda cuadrada deben usarse en todos los experimentos (Draghia-Akli y Smith, 2003) y suministrarse con el electroporador CELLECTRA® de corriente constante (VGX Pharmaceuticals, Blue Bell, PA). Las condiciones de EP se seleccionan para que sean las siguientes: 0,5 A, 3 pulsos, 52 ms, 1 s entre pulsos.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> VGX Pharmaceuticals, Inc. Ramanathan, Mathura Sardesai, Niranjana

<120> Vacunas nuevas frente a múltiples subtipos del virus del dengue

<130> 133121.01002

<150> 61/020.490

<151> 11-01-2008

<160> 16

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 363

<212> ADN

<213> Virus del Dengue tipo 1

<400> 1

ES 2 685 435 T3

aagggcacca gctacgtgat gtgcaccggc agcttcaagc tggaaaaaga ggtggccgag 60  
 actcagcacg gcactgtgct cgtccaggtc aagtacgagg gcaccgacgc cccctgcaag 120  
 atccccctca gcaccaaga cgagaagggc gtgacacaga acggccggct gatcaocgcc 180  
 aaccccatcg tgaccgacaa agaaaagccc gtgaacatcg agaccgagcc ccccttcggc 240  
 gagagetaca tcgtggtggg agccggcgag aaggccctca agctgagttg gttcaaaaag 300  
 ggcagcagca tcggcaagat gttcgaggcc accgccaggg gcgctcgag gatggctatt 360  
 ctc 363

5 <210> 2  
 <211> 363  
 <212> ADN  
 <213> Virus del Dengue tipo 2

<400> 2

aagggcatgt cctacagcat gtgtactggc aagttcaagg tcgtcaaaga gatcgccgaa 60  
 acacaacacg ggaccatcgt gatccgggtg cagtatgagg gcgacggcag cccttgtaag 120  
 atccctttcg agatcatgga cctggaaaag cggcacgtgc tgggccgct gatcacagtg 180  
 aatcctatcg tgacagagaa ggacagccct gtgaatattg aggcagagcc accatttggc 240  
 gactcctaca tcatcatcgg cgtggagccc ggcagctga agctgaattg gtttaagaag 300  
 gggctctcca ttgggcagat gtttgagact actatgagag gcgccaagag aatggctatt 360  
 ctc 363

10 <210> 3  
 <211> 363  
 <212> ADN  
 15 <213> Virus del Dengue tipo 3

<400> 3

aagggcatga gttacgcaat gtgtctgaac accttcgtgc tgaagaaaga agtgagcgag 60  
 acacagcatg gcacaatcct gattaaggtg gagtacaagg gcgaggatgc cccttgcaag 120  
 attccattct ccaccgagga cggccagggc aaggctcaca acggcagact gattacagcc 180  
 aacctgtgg tgaccaagaa agaggaacca gtcaatatcg aagccgaacc accattcggc 240  
 gagtccaaca ttgtgatcgg cattggcgat aaagccctga aatcaactg gtataagaag 300  
 ggctcaagca tagggaaaat gtttgaggca actgcccgcg gagcaagaag aatggctatc 360  
 ttg 363

20 <210> 4  
 <211> 363  
 <212> ADN  
 <213> Virus del Dengue tipo 4

ES 2 685 435 T3

<400> 4

```

aagggcatgt cttacactat gtgctctgga aagttcagca tcgacaaaga gatggctgaa      60
accagcatg gaaccaccgt ggtgaagggtg aaatatgaag gcgctggggc tcctgtaag      120
gtgcccacatg agatcagggg cgtgaacaaa gaaaaagtgg tgggccggat catcagcagc      180
accctttctg ccgagaacac caacagcgtg accaacatcg agctggaacc ccctttcggc      240
gattcttata tcgtgattgg cgtggggcgac tccgccctga ccctgcactg gttccggaag      300
ggctcctcta taggaaagat gtttgaagc acctaccggg gagccaaacg catggccatc      360
ctg                                                                              363

```

5

<210> 5  
 <211> 1515  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10

<220>  
 <223> ADN del antígeno universal del Dengue

15

<400> 5

```

aagggcacca gctacgtgat gtgcaccggc agcttcaagc tggaaaaaga ggtggccgag      60
actcagcacg gcactgtgct cgtccaggtc aagtacgagg gcaccgacgc ccctgcaag      120
atcccccttca gcacccaaga cgagaagggc gtgacacaga acggccggct gatcacggcc      180
aaccctcatcg tgaccgacaa agaaaagccc gtgaacatcg agaccgagcc ccccttcggc      240
gagagctaca tcgtggtggg agccggcgag aaggccctca agctgagttg gttcaaaaag      300
ggcagcagca tcggcaagat gttcgaggcc accgccaggg gcgctcgcag gatggctatt      360
ctccggggca ggaagcggcg gagcaagggc atgtcctaca gcatgtgtac tggcaagttc      420
aaggtcgtca aagagatcgc cgaaacacaa cacgggacca tcgtgatccg ggtgcagtat      480

```

ES 2 685 435 T3

gagggcgacg gcagcccttg taagatccct ttcgagatca tggacctgga aaagcggcac 540  
 gtgctgggcc gcctgatcac agtgaatcct atcgtgacag agaaggacag ccctgtgaat 600  
 attgaggcag agccaccatt tggcgactcc tacatcatca tcggcgtgga gcccgccag 660  
 ctgaagctga attggtttaa gaaggggtcc tccattgggc agatgtttga gactactatg 720  
 agagggcgcca agagaatggc tattctcaga ggcggaaga gaaggtccaa gggcatgagt 780  
 tacgcaatgt gtctgaacac cttcgtgctg aagaaagaag tgagcgagac acagcatggc 840  
 acaatcctga ttaaggtgga gtacaagggc gaggatgcc cttgcaagat tccattctcc 900  
 accgaggacg gccagggcaa ggctcacaac ggcagactga ttacagccaa ccctgtggtg 960  
 accaagaaag aggaaccagt caatatcgaa gccgaaccac cattcggcga gtccaacatt 1020  
 gtgatcggca ttggcgataa agccctgaaa atcaactggt ataagaaggg ctcaagcata 1080  
 gggaaaatgt ttgaggcaac tgcccgcgga gcaagaagaa tggctatctt gcgtgggaga 1140  
 aagcgcgggt caaagggcat gtcttacct atgtgctctg gaaagttcag catcgacaaa 1200  
 gagatggctg aaaccagca tgggaaccacc gtggtgaagg tgaaatatga aggcgctggg 1260  
 gtcacctgta agtgcccat cgagatcagg gacgtgaaca aagaaaaagt ggtgggccgg 1320  
 atcatcagca gcacccttt cgccgagaac accaacagcg tgaccaacat cgagctggaa 1380  
 cccctttcg gcgattctta tatcgtgatt ggcgtgggcg actccgcct gaccctgcac 1440  
 tggttccgga agggctcctc tataggaaag atgtttgaaa gcacctaccg gggagccaaa 1500  
 cgcatggcca tcctg 1515

<210> 6  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Virus del Dengue tipo 1

5

<400> 6

Lys Gly Thr Ser Tyr Val Met Cys Thr Gly Ser Phe Lys Leu Glu Lys  
 1 5 10 15

Glu Val Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Val Leu Val Gln Val Lys Tyr  
 20 25 30

Glu Gly Thr Asp Ala Pro Cys Lys Ile Pro Phe Ser Thr Gln Asp Glu  
 35 40 45

Lys Gly Val Thr Gln Asn Gly Arg Leu Ile Thr Ala Asn Pro Ile Val  
 50 55 60

Thr Asp Lys Glu Lys Pro Val Asn Ile Glu Thr Glu Pro Pro Phe Gly  
 65 70 75 80

10

ES 2 685 435 T3

Glu Ser Tyr Ile Val Val Gly Ala Gly Glu Lys Ala Leu Lys Leu Ser  
 85 90 95

Trp Phe Lys Lys Gly Ser Ser Ile Gly Lys Met Phe Glu Ala Thr Ala  
 100 105 110

Arg Gly Ala Arg Arg Met Ala Ile Leu  
 115 120

<210> 7  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Virus del Dengue tipo 2

5

<400> 7

Lys Gly Met Ser Tyr Ser Met Cys Thr Gly Lys Phe Lys Val Val Lys  
 1 5 10 15

Glu Ile Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Ile Val Ile Arg Val Gln Tyr  
 20 25 30

Glu Gly Asp Gly Ser Pro Cys Lys Ile Pro Phe Glu Ile Met Asp Leu  
 35 40 45

Glu Lys Arg His Val Leu Gly Arg Leu Ile Thr Val Asn Pro Ile Val  
 50 55 60

Thr Glu Lys Asp Ser Pro Val Asn Ile Glu Ala Glu Pro Pro Phe Gly  
 65 70 75 80

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

Trp Phe Lys Lys Gly Ser Ser Ile Gly Gln Met Phe Glu Thr Thr Met  
 100 105 110

Arg Gly Ala Lys Arg Met Ala Ile Leu  
 115 120

10

<210> 8  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Virus del Dengue tipo 3

15

<400> 8

Lys Gly Met Ser Tyr Ala Met Cys Leu Asn Thr Phe Val Leu Lys Lys  
 1 5 10 15

ES 2 685 435 T3

Glu Val Ser Glu Thr Gln His Gly Thr Ile Leu Ile Lys Val Glu Tyr  
 20 25 30

Lys Gly Glu Asp Ala Pro Cys Lys Ile Pro Phe Ser Thr Glu Asp Gly  
 35 40 45

Gln Gly Lys Ala His Asn Gly Arg Leu Ile Thr Ala Asn Pro Val Val  
 50 55 60

Thr Lys Lys Glu Glu Pro Val Asn Ile Glu Ala Glu Pro Pro Phe Gly  
 65 70 75 80

Glu Ser Asn Ile Val Ile Gly Ile Gly Asp Lys Ala Leu Lys Ile Asn  
 85 90 95

Trp Tyr Lys Lys Gly Ser Ser Ile Gly Lys Met Phe Glu Ala Thr Ala  
 100 105 110

Arg Gly Ala Arg Arg Met Ala Ile Leu  
 115 120

5

<210> 9  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Virus del Dengue tipo 4  
 <400> 9

Lys Gly Met Ser Tyr Thr Met Cys Ser Gly Lys Phe Ser Ile Asp Lys  
 1 5 10 15

Glu Met Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Thr Val Val Lys Val Lys Tyr  
 20 25 30

Glu Gly Ala Gly Ala Pro Cys Lys Val Pro Ile Glu Ile Arg Asp Val  
 35 40 45

Asn Lys Glu Lys Val Val Gly Arg Ile Ile Ser Ser Thr Pro Phe Ala  
 50 55 60

Glu Asn Thr Asn Ser Val Thr Asn Ile Glu Leu Glu Pro Pro Phe Gly  
 65 70 75 80

Asp Ser Tyr Ile Val Ile Gly Val Gly Asp Ser Ala Leu Thr Leu His  
 85 90 95

Trp Phe Arg Lys Gly Ser Ser Ile Gly Lys Met Phe Glu Ser Thr Tyr  
 100 105 110

10

ES 2 685 435 T3

Arg Gly Ala Lys Arg Met Ala Ile Leu  
 115 120

5 <210> 10  
 <211> 505  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Antígeno universal del Dengue

<400> 10

Lys Gly Thr Ser Tyr Val Met Cys Thr Gly Ser Phe Lys Leu Glu Lys  
 1 5 10 15

Glu Val Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Val Leu Val Gln Val Lys Tyr  
 20 25 30

Glu Gly Thr Asp Ala Pro Cys Lys Ile Pro Phe Ser Thr Gln Asp Glu  
 35 40 45

Lys Gly Val Thr Gln Asn Gly Arg Leu Ile Thr Ala Asn Pro Ile Val  
 50 55 60

Thr Asp Lys Glu Lys Pro Val Asn Ile Glu Thr Glu Pro Pro Phe Gly  
 65 70 75 80

Glu Ser Tyr Ile Val Val Gly Ala Gly Glu Lys Ala Leu Lys Leu Ser  
 85 90 95

Trp Phe Lys Lys Gly Ser Ser Ile Gly Lys Met Phe Glu Ala Thr Ala  
 100 105 110

Arg Gly Ala Arg Arg Met Ala Ile Leu Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser  
 115 120 125

Lys Gly Met Ser Tyr Ser Met Cys Thr Gly Lys Phe Lys Val Val Lys  
 130 135 140

Glu Ile Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Ile Val Ile Arg Val Gln Tyr  
 145 150 155 160

Glu Gly Asp Gly Ser Pro Cys Lys Ile Pro Phe Glu Ile Met Asp Leu  
 165 170 175

Glu Lys Arg His Val Leu Gly Arg Leu Ile Thr Val Asn Pro Ile Val  
 180 185 190

Thr Glu Lys Asp Ser Pro Val Asn Ile Glu Ala Glu Pro Pro Phe Gly

ES 2 685 435 T3

	195						200							205	
Asp	Ser	Tyr	Ile	Ile	Ile	Gly	Val	Glu	Pro	Gly	Gln	Leu	Lys	Leu	Asn
	210					215					220				
Trp	Phe	Lys	Lys	Gly	Ser	Ser	Ile	Gly	Gln	Met	Phe	Glu	Thr	Thr	Met
225					230					235					240
Arg	Gly	Ala	Lys	Arg	Met	Ala	Ile	Leu	Arg	Gly	Arg	Lys	Arg	Arg	Ser
				245					250					255	
Lys	Gly	Met	Ser	Tyr	Ala	Met	Cys	Leu	Asn	Thr	Phe	Val	Leu	Lys	Lys
			260					265					270		
Glu	Val	Ser	Glu	Thr	Gln	His	Gly	Thr	Ile	Leu	Ile	Lys	Val	Glu	Tyr
		275					280					285			
Lys	Gly	Glu	Asp	Ala	Pro	Cys	Lys	Ile	Pro	Phe	Ser	Thr	Glu	Asp	Gly
	290					295					300				
Gln	Gly	Lys	Ala	His	Asn	Gly	Arg	Leu	Ile	Thr	Ala	Asn	Pro	Val	Val
305					310					315					320
Thr	Lys	Lys	Glu	Glu	Pro	Val	Asn	Ile	Glu	Ala	Glu	Pro	Pro	Phe	Gly
				325					330					335	
Glu	Ser	Asn	Ile	Val	Ile	Gly	Ile	Gly	Asp	Lys	Ala	Leu	Lys	Ile	Asn
			340					345					350		
Trp	Tyr	Lys	Lys	Gly	Ser	Ser	Ile	Gly	Lys	Met	Phe	Glu	Ala	Thr	Ala
		355					360					365			
Arg	Gly	Ala	Arg	Arg	Met	Ala	Ile	Leu	Arg	Gly	Arg	Lys	Arg	Arg	Ser
	370					375					380				
Lys	Gly	Met	Ser	Tyr	Thr	Met	Cys	Ser	Gly	Lys	Phe	Ser	Ile	Asp	Lys
385					390					395					400
Glu	Met	Ala	Glu	Thr	Gln	His	Gly	Thr	Thr	Val	Val	Lys	Val	Lys	Tyr
				405					410					415	
Glu	Gly	Ala	Gly	Ala	Pro	Cys	Lys	Val	Pro	Ile	Glu	Ile	Arg	Asp	Val
			420					425					430		
Asn	Lys	Glu	Lys	Val	Val	Gly	Arg	Ile	Ile	Ser	Ser	Thr	Pro	Phe	Ala
		435					440					445			

ES 2 685 435 T3

Glu Asn Thr Asn Ser Val Thr Asn Ile Glu Leu Glu Pro Pro Phe Gly  
 450 455 460

Asp Ser Tyr Ile Val Ile Gly Val Gly Asp Ser Ala Leu Thr Leu His  
 465 470 475 480

Trp Phe Arg Lys Gly Ser Ser Ile Gly Lys Met Phe Glu Ser Thr Tyr  
 485 490 495

Arg Gly Ala Lys Arg Met Ala Ile Leu  
 500 505

5 <210> 11  
 <211> 60  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 11  
 gccaccatgg actggacctg gatcctgttt ctggtcgctg ctgccactcg ggtgcacagc 60

<210> 12  
 <211> 441  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Casete de expresión del virus del Dengue 1

20 <400> 12  
 ggtaccgcca ccatggactg gacctggatc ctgtttctgg tcgctgctgc cactcgggtg 60  
 cacagcaagg gcaccagcta cgtgatgtgc accggcagct tcaagctgga aaaagagggtg 120  
 gccgagactc agcacggcac tgtgctcgtc caggtcaagt acgagggcac cgacgcccc 180  
 tgcaagatcc ccttcagcac ccaagacgag aagggcgtga cacagaacgg ccggctgac 240  
 accgccaacc ccatcgtgac cgacaaagaa aagcccgtga acatcgagac cgagcccc 300  
 ttcggcgaga gctacatcgt ggtgggagcc ggcgagaagg ccctcaagct gagttggttc 360  
 aaaaagggca gcagcatcgg caagatgttc gaggccaccg ccagggggcg tcgcaggatg 420  
 gctattctct gatgactgca g 441

25 <210> 13  
 <211> 441  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Casete de expresión del virus del Dengue 2

<400> 13

ES 2 685 435 T3

```

ggtaccgcca ccatggactg gacctggatc ctgtttctgg tcgctgctgc cactcgggtg      60
cacagcaagg gcatgtccta cagcatgtgt actggcaagt tcaaggtcgt caaagagatc      120

gccgaaacac aacacgggac catcgtgac cgggtgcagt atgagggcga cggcagccct      180
tgtaagatcc ctttcgagat catggacctg gaaaagcggc acgtgctggg ccgcctgac      240
acagtgaatc ctatcgtgac agagaaggac agccctgtga atattgaggc agagccacca      300
tttggggact cctacatcat catcggcgtg gagcccggcc agctgaagct gaattggttt      360
aagaaggggt cctccattgg gcagatgttt gagactacta tgagaggcgc caagagaatg      420
gctattctct gatgactgca g                                             441

```

<210> 14  
 <211> 441  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Casete de expresión del virus del Dengue 3

10

<400> 14

```

ggtaccgcca ccatggactg gacctggatc ctgtttctgg tcgctgctgc cactcgggtg      60
cacagcaagg gcatgagtta cgcaatgtgt ctgaacacct tcgtgctgaa gaaagaagtg      120
agcgagacac agcatggcac aatcctgatt aaggtggagt acaagggcga ggatgcccct      180
tgcaagattc cattctccac cgaggacggc cagggcaagg ctcaaacgg cagactgatt      240
acagccaacc ctgtggtgac caagaaagag gaaccagtca atatcgaagc cgaaccacca      300
ttcggggagt ccaacattgt gatcggcatt ggcgataaag ccctgaaaat caactggtat      360
aagaagggct caagcatagg gaaaatgttt gaggcaactg cccgcggagc aagaagaatg      420
gctatcttgt gatgactgca g                                             441

```

<210> 15  
 <211> 441  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15

<220>  
 <223> Casete de expresión del virus del Dengue 4

20

<400> 15

ES 2 685 435 T3

```
ggtaaccgcca ccatggactg gacctggatc ctgtttctgg tcgctgctgc cactcgggtg      60
cacagcaagg gcatgtetta cactatgtgc tctggaaagt tcagcatcga caaagagatg      120
gctgaaaccc agcatggaac caccgtggtg aaggtgaaat atgaaggcgc tggggctccc      180
tgtaagggtgc ccatcgagat cagggacgtg aacaaagaaa aagtgggtgg ccggatcatc      240
agcagcacc ctttcgccga gaacaccaac agcgtgacca acatcgagct ggaaccccct      300
ttcggcgatt cttatatcgt gattggcgtg ggcgactccg ccctgaccct gcactgggtc      360
cggaagggct cctctatagg aaagatgttt gaaagcacct accggggagc caaacgcatg      420

gccatcctgt gatgactgca g                                          441
```

<210> 16  
<211> 1593  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5

<220>  
<223> Casete de expresión de Dengue universal

10

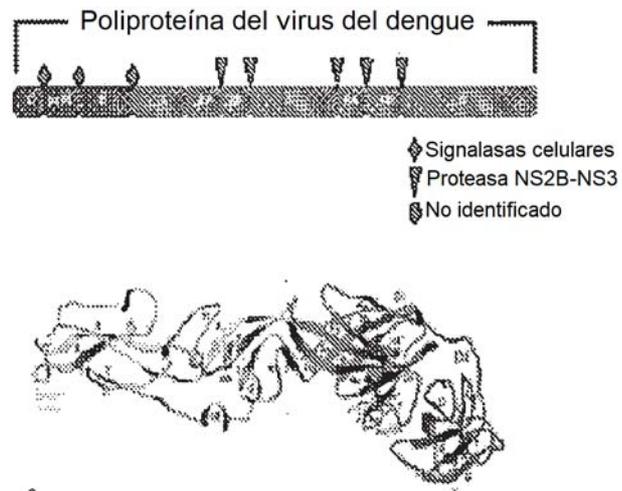
<400> 16

ES 2 685 435 T3

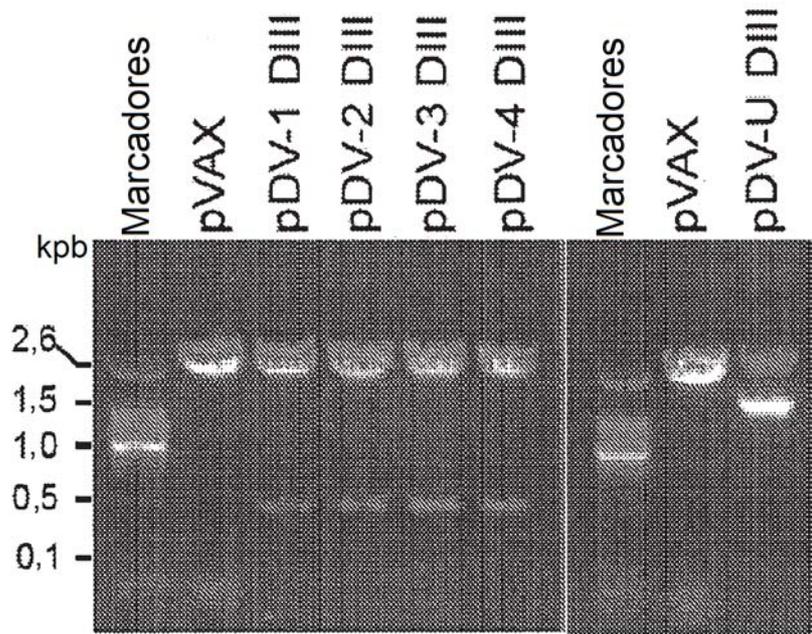
ggtaccgcca ccatggactg gacctggatc ctgtttctgg tcgctgctgc cactcgggtg 60  
 cacagcaagg gcaccagcta cgtgatgtgc accggcagct tcaagctgga aaaagaggtg 120  
 gccgagactc agcacggcac tgtgctcgtc caggtcaagt acgagggcac cgacgcccc 180  
 tgcaagatcc ccttcagcac ccaagacgag aagggcgtga cacagaacgg cgggctgatc 240  
 accgccaacc ccatcgtgac cgacaaagaa aagcccgtga acatcgagac cgagcccccc 300  
 ttcggcgaga gctacatcgt ggtgggagcc ggcgagaagg ccctcaagct gagttggttc 360  
 aaaaagggca gcagcatcgg caagatgttc gagggcaccg ccagggggcg tcgcaggatg 420  
 gctattctcc ggggcaggaa gcggcggagc aagggcatgt cctacagcat gtgtactggc 480  
 aagttcaagg tcgtcaaaga gatcgccgaa acacaacacg ggaccatcgt gatccgggtg 540  
 cagtatgagg gcgacggcag cccttgtaag atccctttcg agatcatgga cctggaaaag 600  
 cggcacgtgc tgggcccgcct gatcacagtg aatcctatcg tgacagagaa ggacagccct 660  
 gtgaatattg aggcagagcc accatttggc gactcctaca tcatcatcgg cgtggagccc 720  
 ggccagctga agctgaattg gtttaagaag ggtcctcca ttgggcagat gtttgagact 780  
 actatgagag gcgccaagag aatggctatt ctcagaggcc ggaagagaag gtccaagggc 840  
 atgagttacg caatgtgtct gaacaccttc gtgctgaaga aagaagtgag cgagacacag 900  
 catggcaciaa tcctgattaa ggtggagtac aagggcgagg atgccccttg caagattcca 960  
 ttctccaccg aggacggcca gggcaaggct cacaacggca gactgattac agccaaccct 1020  
 gtggtgacca agaaagagga accagtcaat atcgaagccg aaccaccatt cggcgagtcc 1080  
 aacattgtga tcggcattgg cgataaagcc ctgaaaatca actggtataa gaagggctca 1140  
 agcatagggg aatgtttga ggcaactgcc cgcggagcaa gaagaatggc tatcttgcgt 1200  
 gggagaaaag gccggtcaaa gggcatgtct tacactatgt gctctggaaa gttcagcatc 1260  
 gacaaagaga tggctgaaac ccagcatgga accaccgtgg tgaaggtgaa atatgaaggc 1320  
 gctggggctc cctgtaaggt gcccatcgag atcagggacg tgaacaaaga aaaagtgggt 1380  
 ggccggatca tcagcagcac ccctttcgcc gagaacacca acagcgtgac caacatcgag 1440  
 ctggaacccc ctttcggcga ttcttatatc gtgattggcg tgggcgactc cgccctgacc 1500  
 ctgcactggt tccggaaggg ctctctata ggaaagatgt ttgaaagcac ctaccgggga 1560  
 gccaaaacgca tggccatcct gtgatgactg cag 1593

**REIVINDICACIONES**

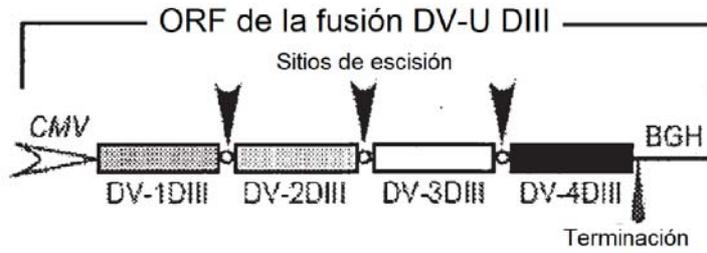
1. Un plásmido de ADN que tiene la capacidad de expresar un polipéptido que suscita una respuesta inmunitaria en un mamífero frente a cuatro subtipos del virus del Dengue, que comprende:
- 5 una secuencia de nucleótidos codificante que expresa el polipéptido, en donde el polipéptido incluye un dominio DIII de cuatro subtipos distintos del virus del Dengue; y un promotor que regula la expresión del polipéptido en el mamífero y está unido operativamente a la secuencia de nucleótidos codificante;
- 10 en donde la secuencia de nucleótidos codificante comprende la SEQ ID NO: 5.
2. El plásmido de ADN de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente una secuencia de poliadenilación unida al extremo C-terminal de la secuencia codificante.
- 15 3. El plásmido de ADN de cualquier reivindicación precedente, en donde la respuesta inmunitaria es una respuesta humoral, una respuesta celular o una respuesta combinada humoral y celular.
4. El plásmido de ADN de la reivindicación 1, en donde la secuencia de nucleótidos codificante es parte de un casete de expresión e incluye la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 16.
- 20 5. Una vacuna que comprende el plásmido de DNA de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende adicionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable que es un agente que facilita la transfección.
- 25 7. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el agente que facilita la transfección es un complejo inmunoestimulante (ISCOM), adyuvante incompleto de Freund, un análogo de LPS tal como monofosforil lípido A, muramil péptidos, análogos de quinina o vesículas tales como escualeno, o ácido hialurónico.
- 30 8. El plásmido de ADN o vacuna de cualquier reivindicación precedente para su uso en un método para suscitar una respuesta inmunitaria en un mamífero frente a al menos dos subtipos distintos del virus del Dengue, en donde suscitar una respuesta inmunitaria comprende:
- 35 suministrar el plásmido de ADN al tejido del mamífero, y electroporar células del tejido con un pulso de energía a una corriente constante eficaz para permitir la entrada del plásmido de ADN en las células.
9. El plásmido de ADN o vacuna para su uso como se reivindica en la reivindicación 8, en donde la etapa de suministro comprende: inyectar el plásmido de ADN en tejido intradérmico, subcutáneo o muscular.
- 40 10. El plásmido de ADN o vacuna para su uso como se reivindica en la reivindicación 9, que comprende adicionalmente:
- 45 preestablecer una corriente que se desea suministrar al tejido; y electroporar células del tejido con un pulso de energía a una corriente constante que es igual a la corriente preestablecida.
11. El plásmido de ADN o vacuna para su uso como se reivindica en la reivindicación 10, en donde la etapa de electroporación comprende adicionalmente:
- 50 medir la impedancia en las células electroporadas; ajustar el nivel de energía del pulso de energía con respecto a la impedancia medida para mantener una corriente constante en las células electroporadas; en donde las etapas de medición y ajuste se producen dentro de la duración del pulso de energía.
- 55 12. El plásmido de ADN o vacuna para su uso como se reivindica en la reivindicación 11, en donde la etapa de electroporación comprende: suministrar el pulso de energía a una pluralidad de electrodos de acuerdo con un patrón de secuencia de pulsos que suministra el pulso de energía en un patrón descentralizado.



**FIG 1.**



**FIG. 2**



MDWTWILFLVAAATRVHSGTSSYVMCTGSFKLEKEVAETQHGTVLVQ  
 VKYEGTDAPCKIPFSTQDEKGVTONGRLITANPIVTDKEKPVNIETE  
 PPFGESYIVVGAGEKALKLSWFKKGSSIGKMFEATARGARRMAIL**RG**  
**RKRRS**KGMSYSMCTGKFKVVEIAETQHGTIVIRVQYEGDGS PCKIP  
 FEIMDLEKRHVLGRLITVNPVTEKDSPVNEAEPFPGDSYIIIGVE  
 PGQLKLNWFKKGSSIGQMFETMRGAKRMAIL**RGRKRRS**KGMSYAMC  
 LNTFVLKKEVSETQHGTILIKVEYKGEDAPCKIPFSTEDGQGKAHNG  
 RLITANPVVTKKEEPVNEAEPFPGESNIVIGIGDKALKINWYKKGSS  
 SIGKMFEATARGARRMAIL**RGRKRRS**KGMSYTMCSGKFSIDKEMAET  
 QHGTTVVKVYEGAGAPCKVPIEIRDVNKEKVVGRIISSTPFAENTN  
 SVTNIELEPPFGDSYIVIGVGD SALT LHWFRKGSSIGKMFESTYRGA  
 KRMAIL

FIG. 3

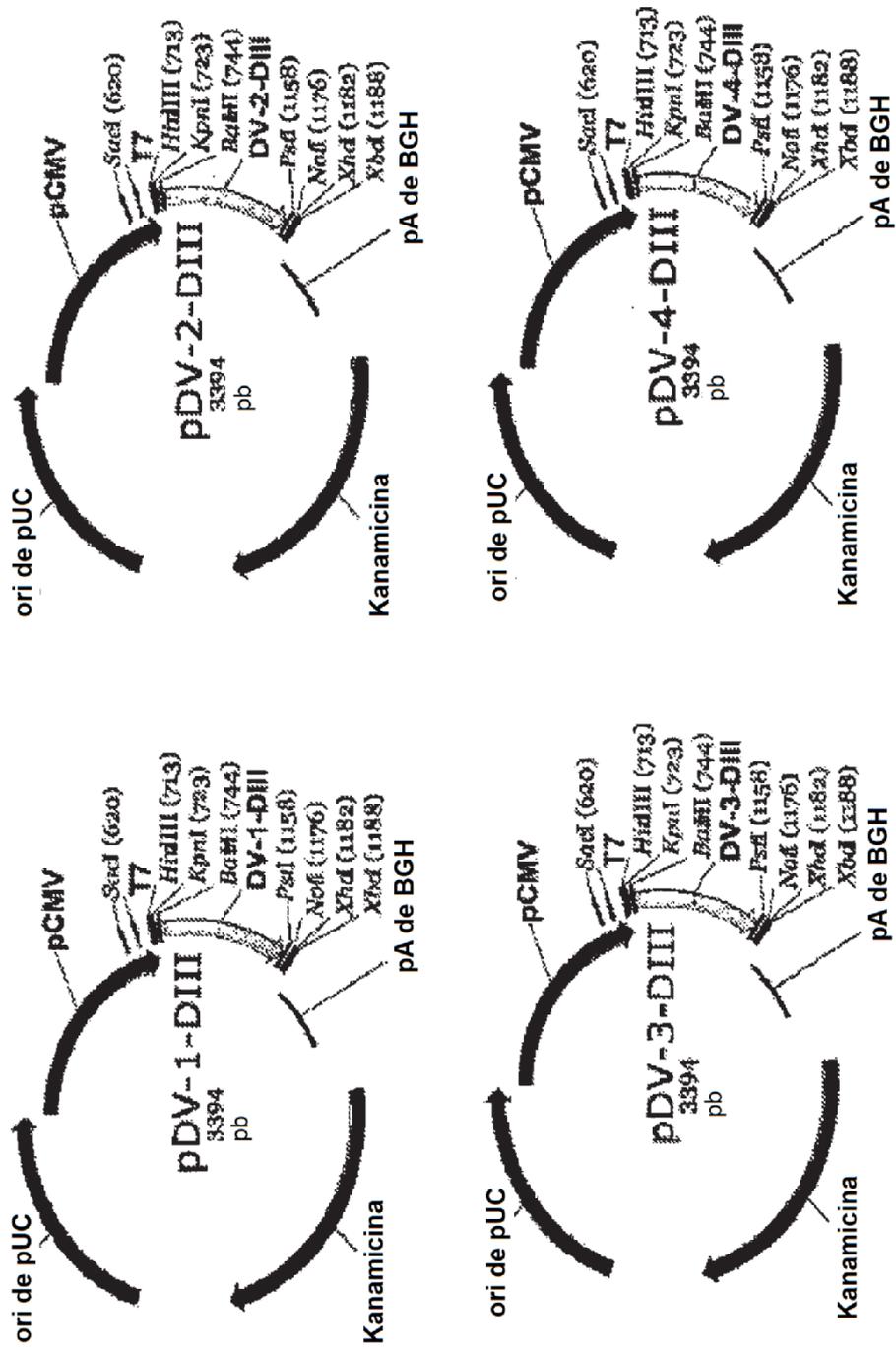


FIG. 4a

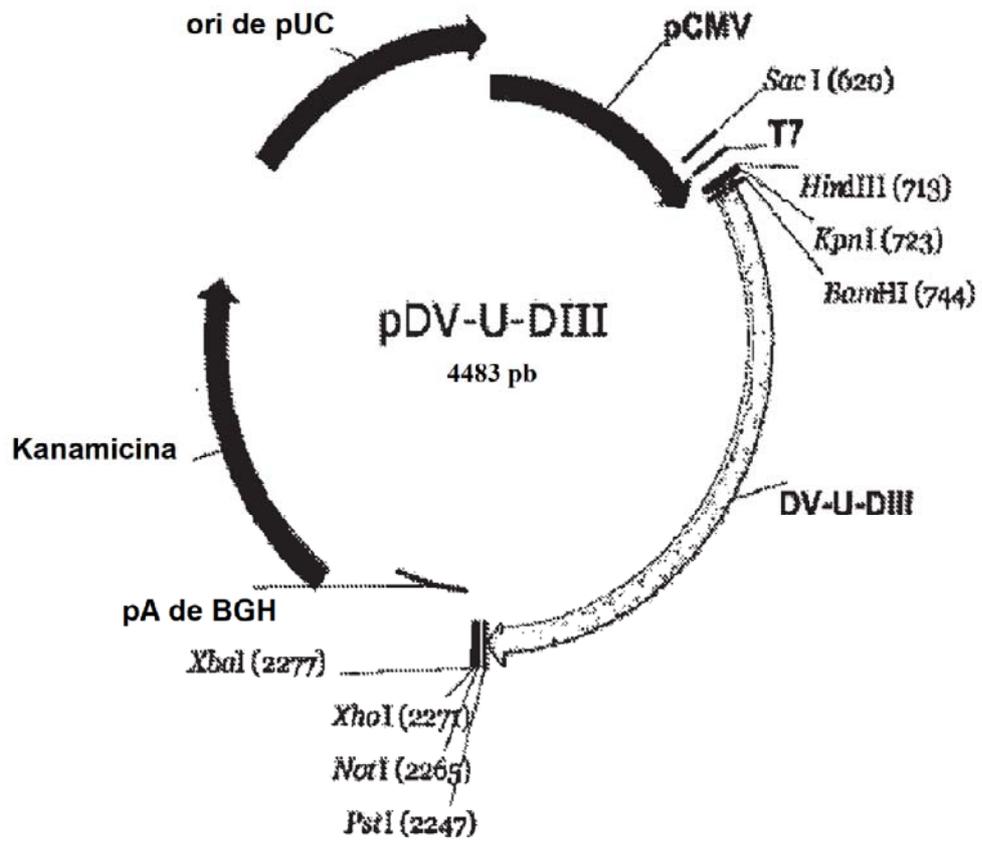
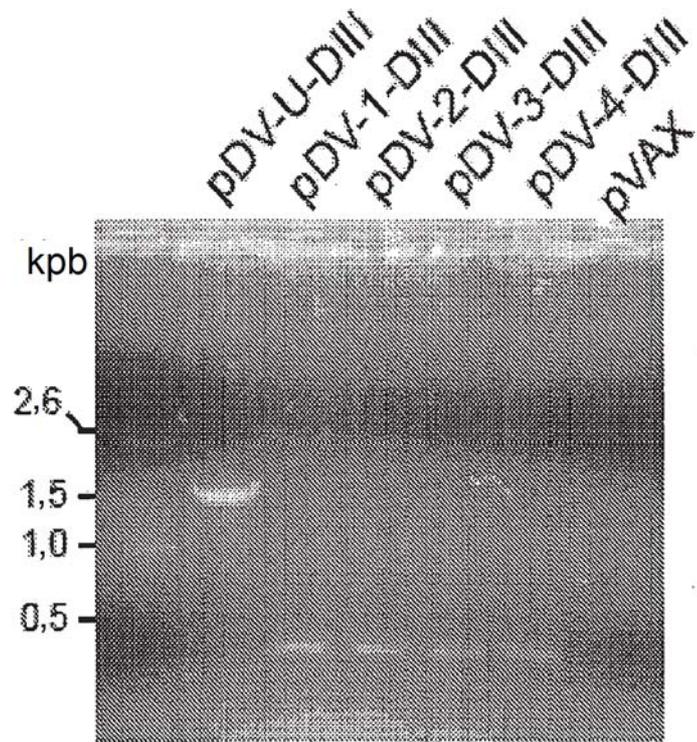
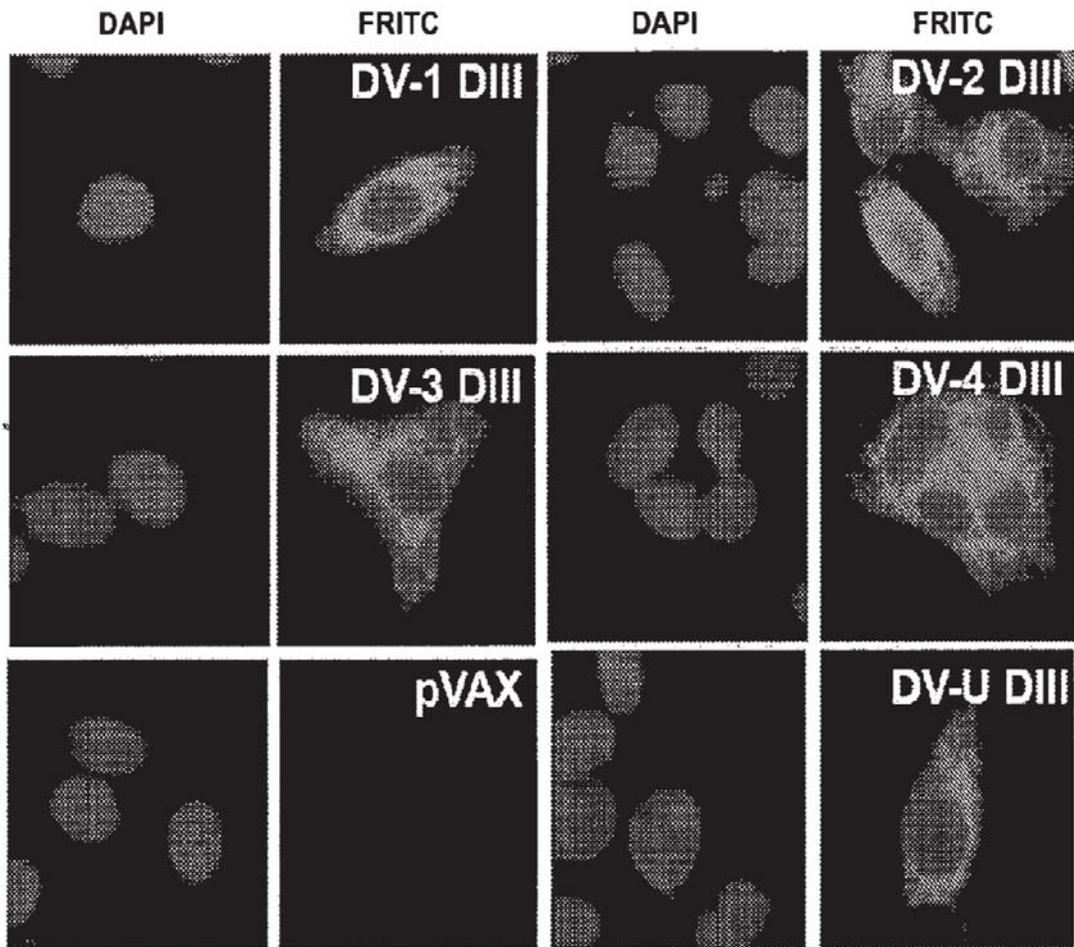


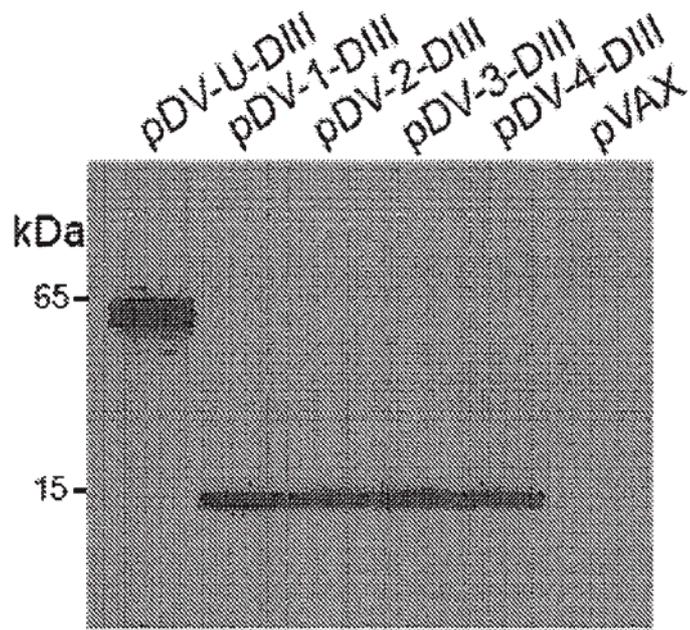
FIG. 4b



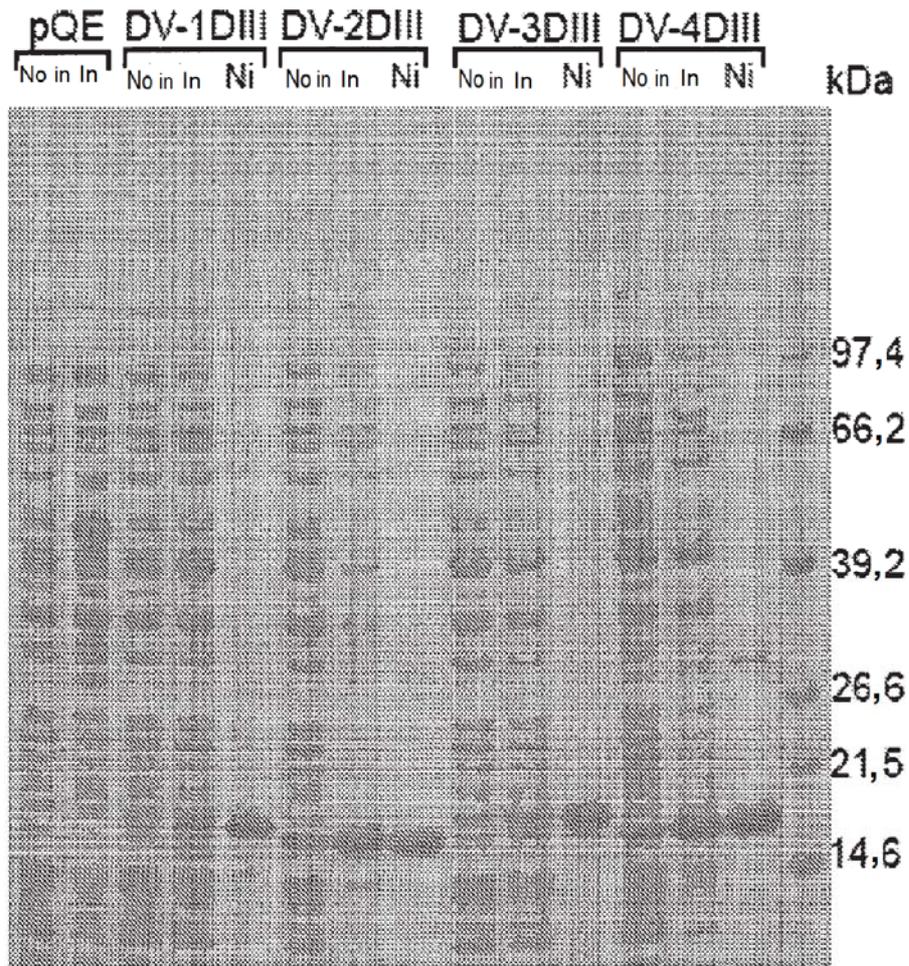
**FIG. 5**



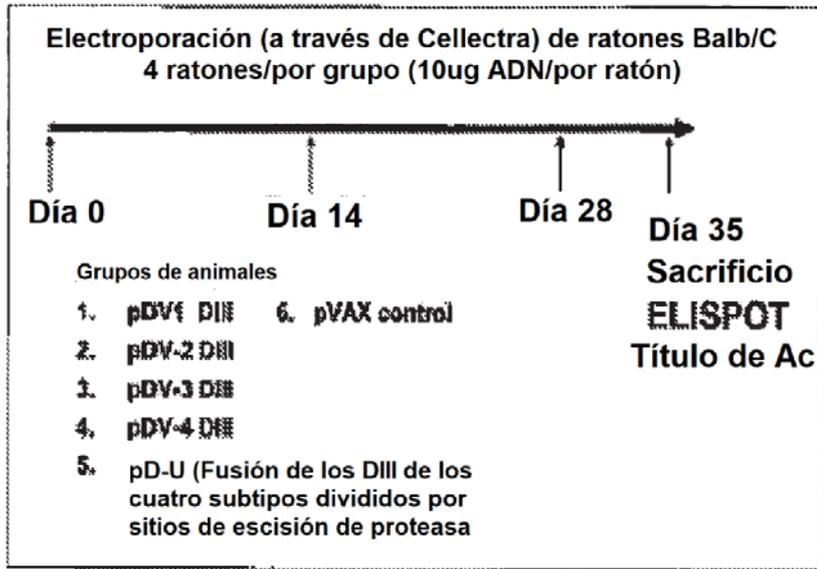
**FIG. 6**



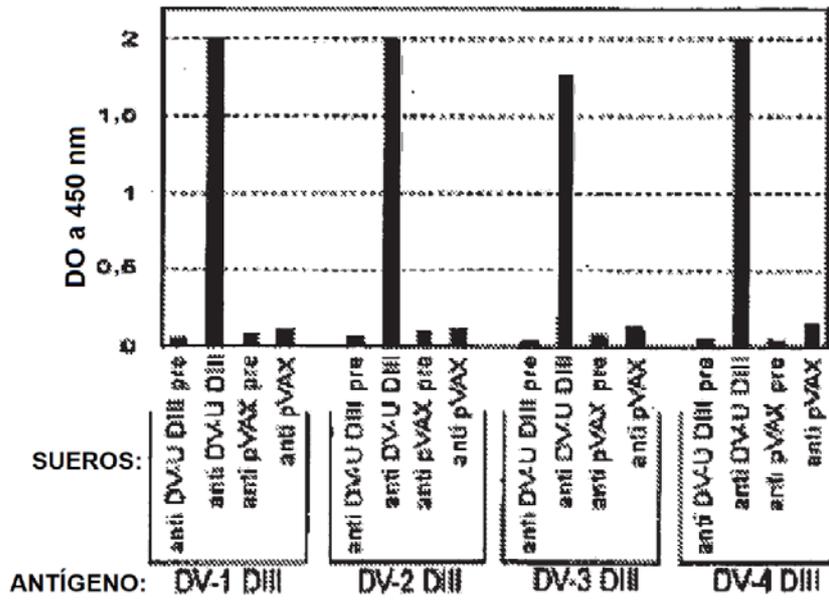
**FIG. 7**



**FIG. 8**



**FIG. 9**



**FIG. 10**

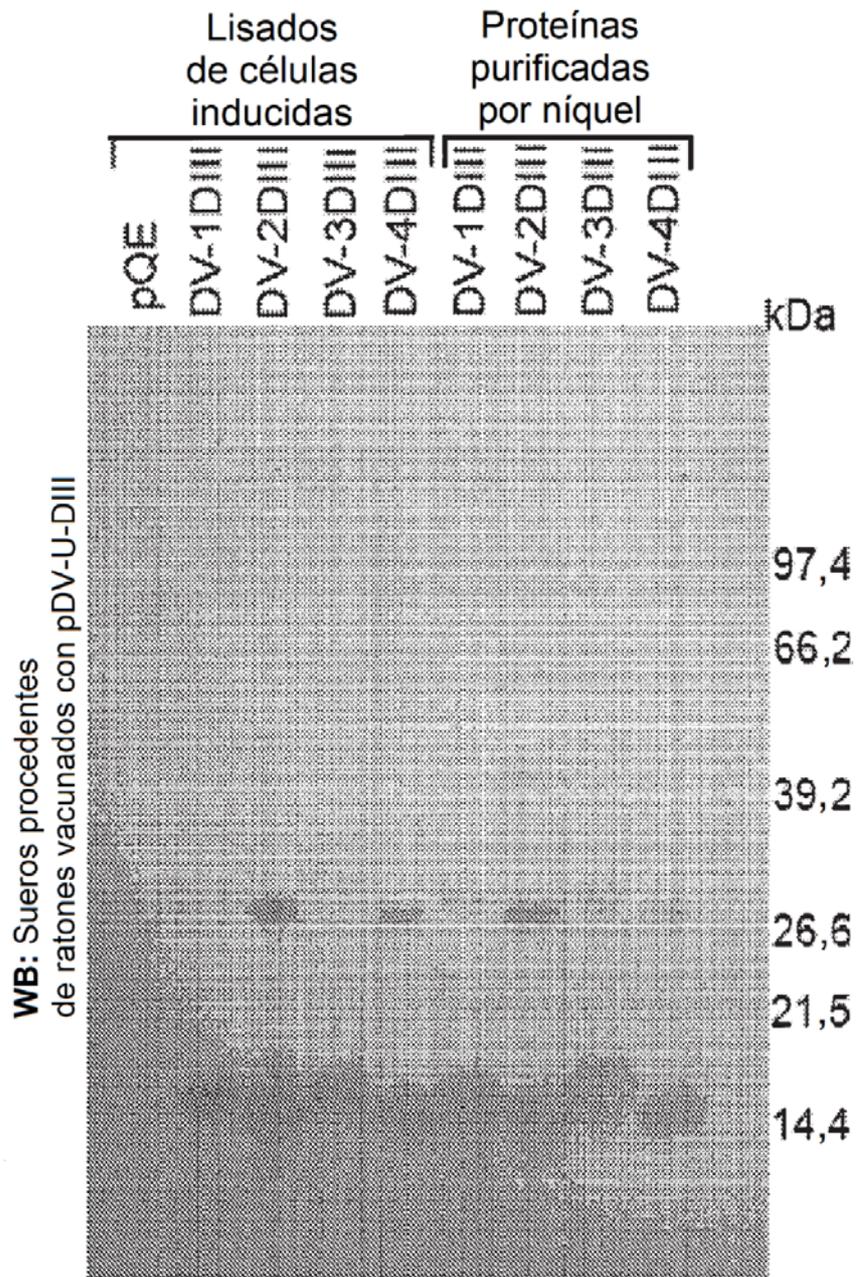


FIG. 11

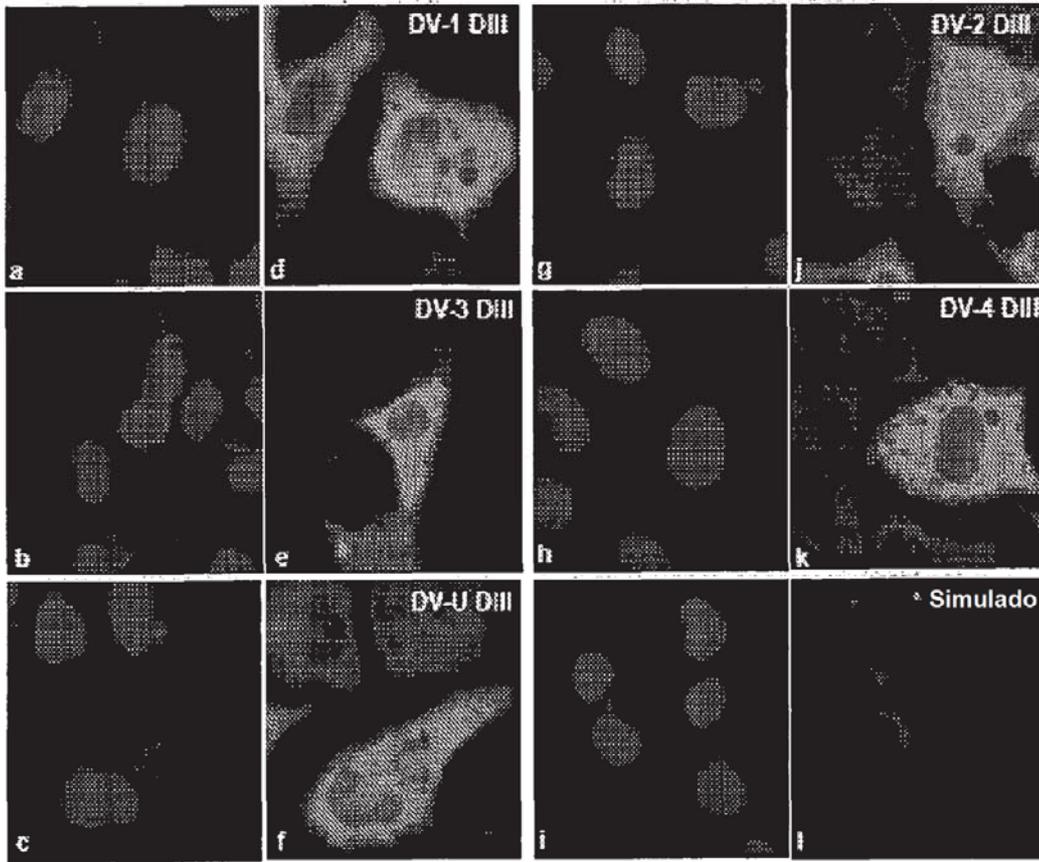
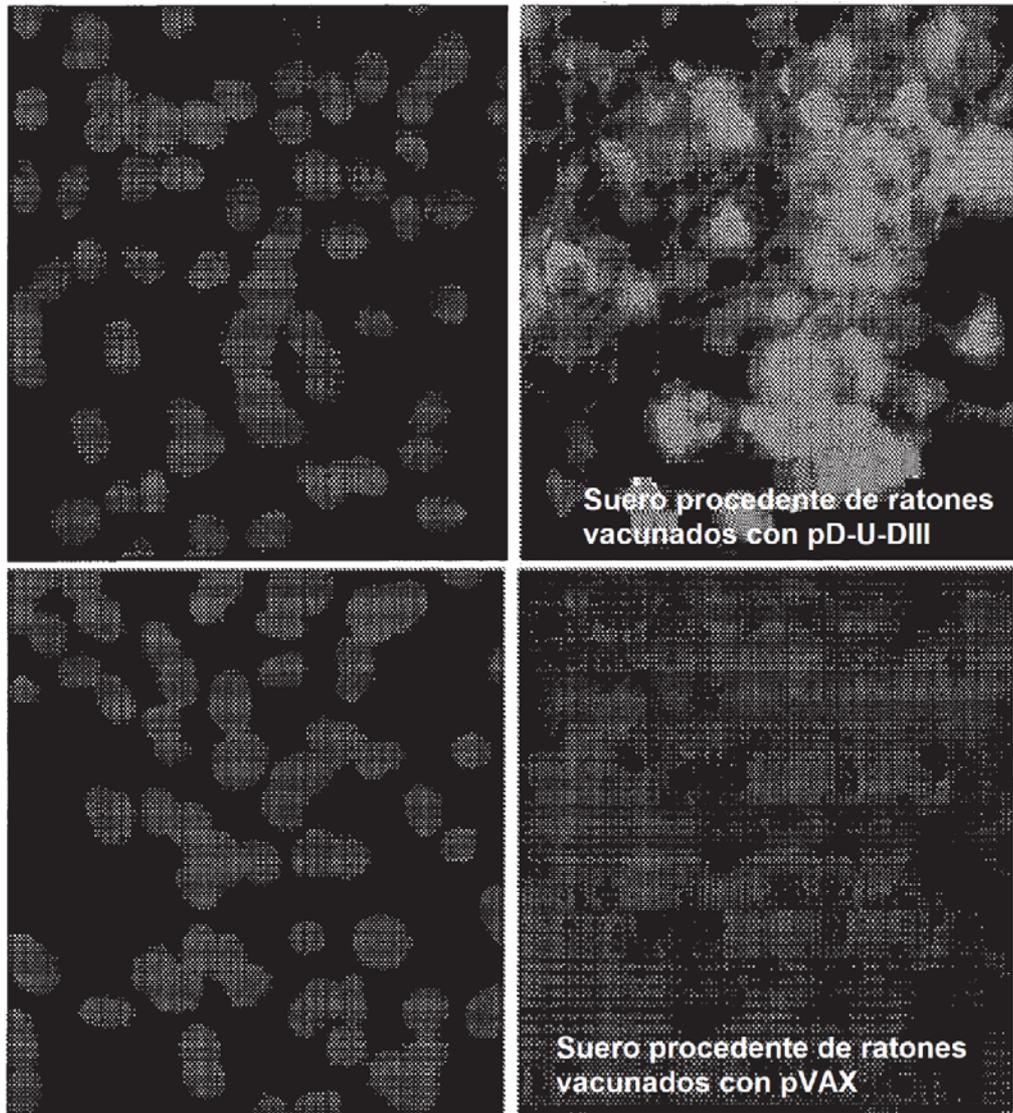


FIG. 12



**FIG. 13**

Título de anticuerpos neutralizantes frente a Dengue 2

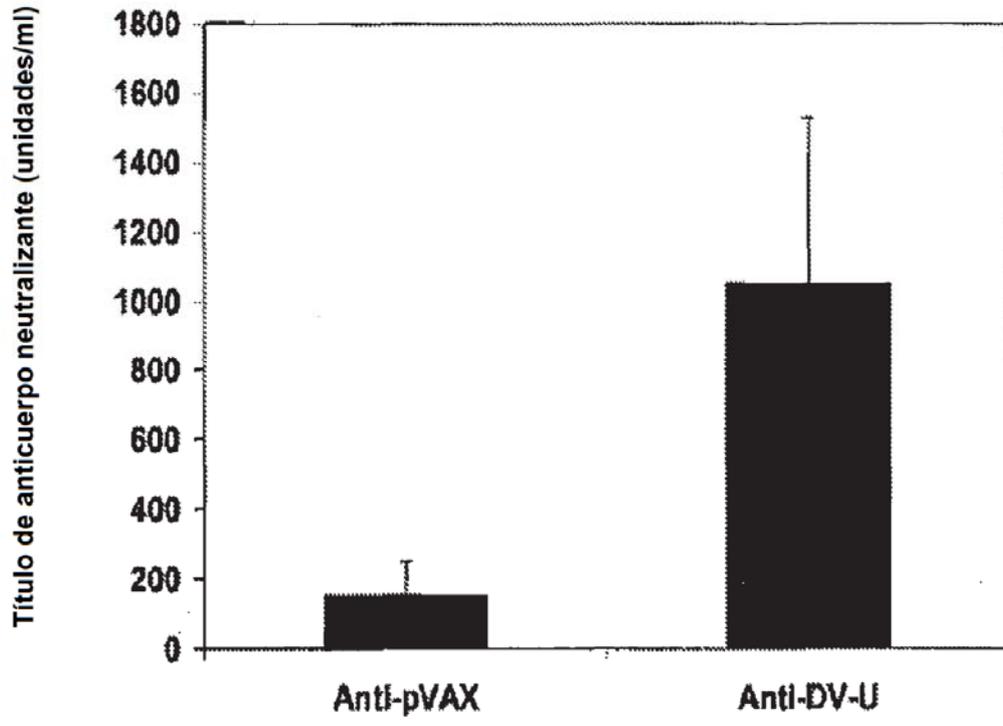
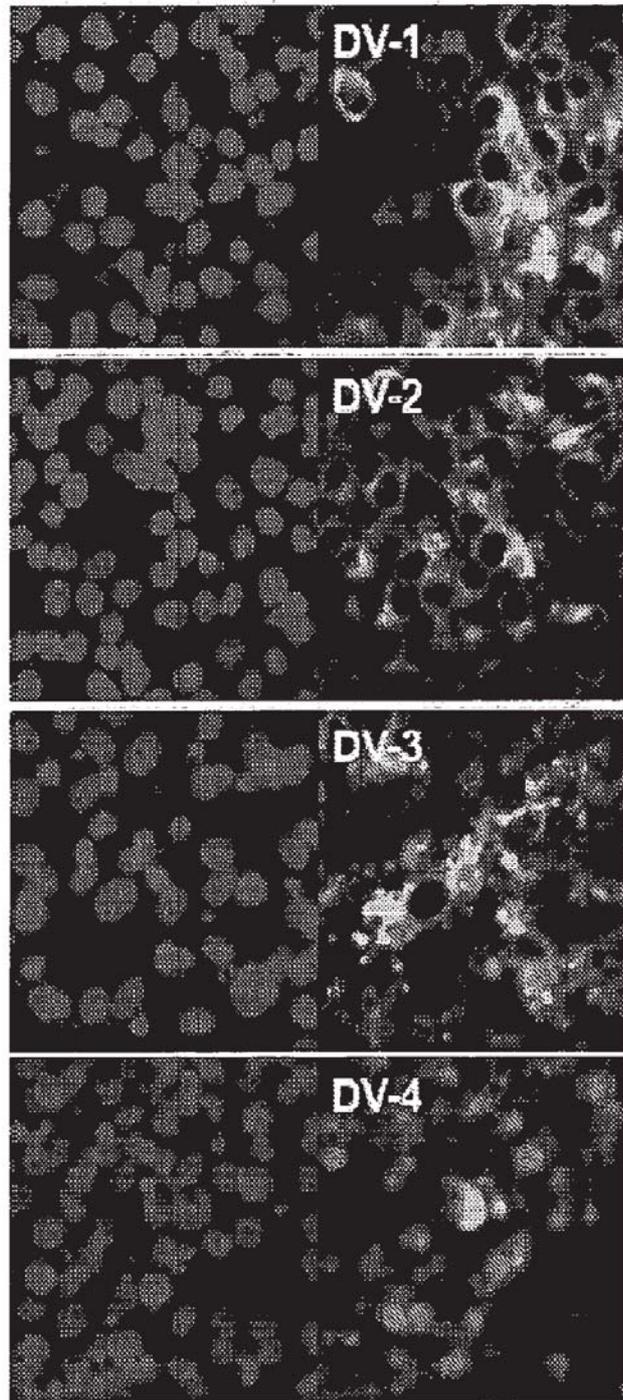
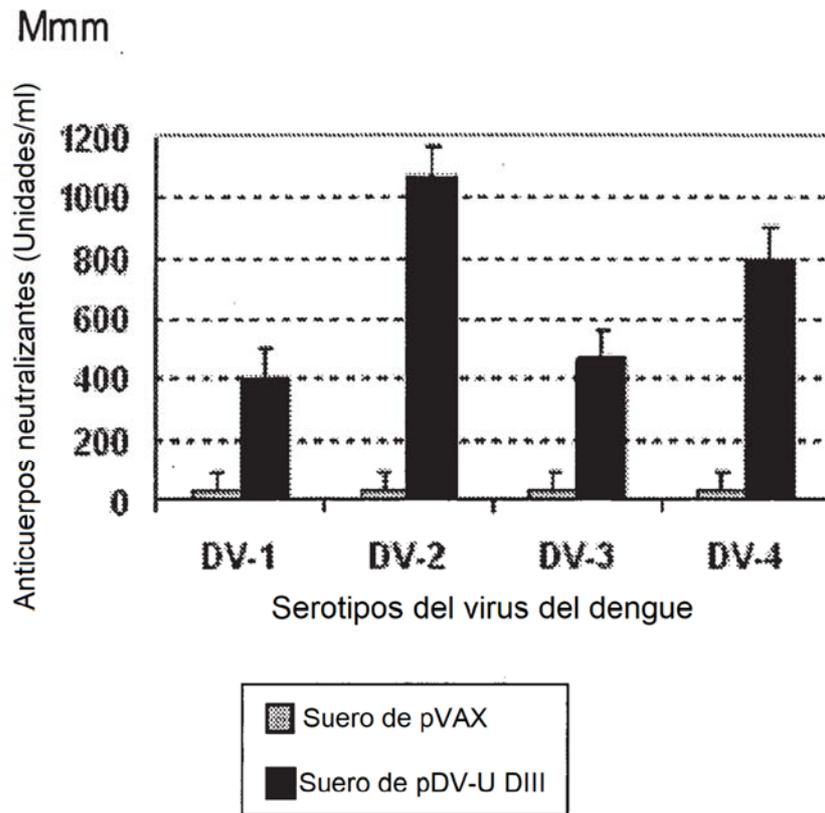


FIG. 14



**FIG. 15**



**FIG. 16**

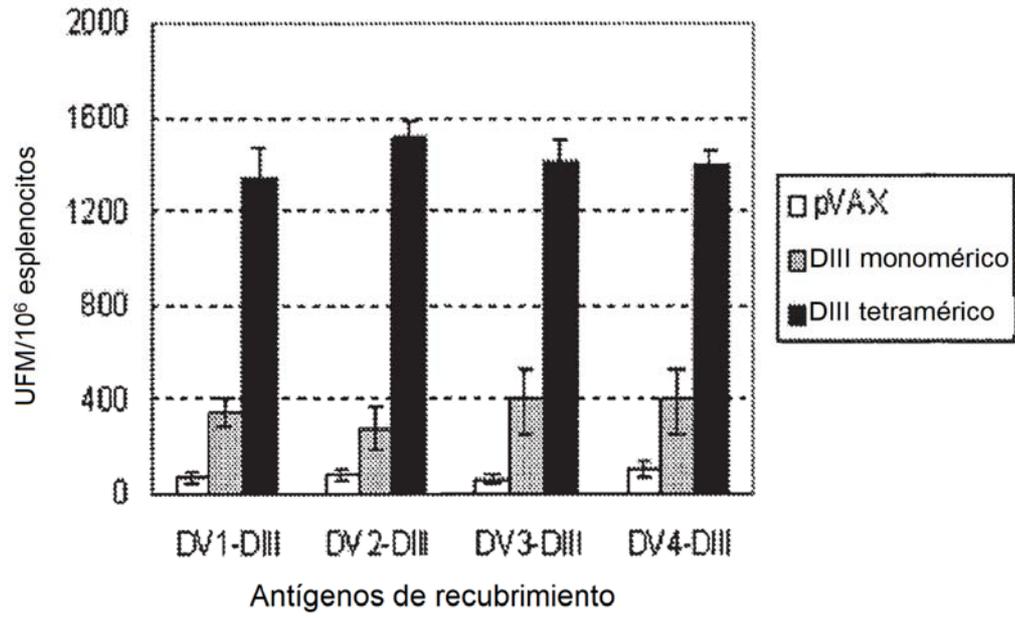


FIG. 17