

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 745 431**

51 Int. Cl.:

C07K 14/005 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

C07K 14/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.06.2014 PCT/US2014/044410**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.12.2014 WO14210358**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2014 E 14817079 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2019 EP 3013852**

54 Título: **Composiciones para vacunas contra el virus del dengue y su uso**

30 Prioridad:

26.06.2013 US 201361839687 P

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

02.03.2020

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT
CHAPEL HILL (100.0%)
308 Bynum Hall, Campus Box 4105
Chapel Hill, NC 27599, US**

72 Inventor/es:

**MESSER, WILLIAM;
BARIC, RALPH;
DESILVA, ARAVINDA y
YOUNT, BOYD**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 745 431 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

Composiciones para vacunas contra el virus del dengue y su uso.

5 Declaración de apoyo gubernamental

Esta invención se realizó con apoyo del gobierno bajo la Subvención No. U54 AI057157 otorgada por el Instituto Nacional de Salud. El gobierno de los Estados Unidos tiene ciertos derechos en la invención.

10 Campo de la invención

La presente invención se dirige a vacunas contra el virus del dengue que inducen anticuerpos neutralizantes contra más de un serotipo del virus del dengue de un solo origen.

15 Antecedentes de la invención

El dengue es un flavivirus transmitido por mosquitos que se está propagando a una velocidad sin precedentes y se ha convertido en una carga económica y para la salud importante en más de 50 países. Las vacunas actuales de DENV que protegen contra los cuatro serotipos, deben administrarse como una formulación "tetravalente" de cuatro virus o cuatro proteínas recombinantes, cada una de las cuales tiene la intención de conferir protección contra ese serotipo. Se desconoce la combinación correcta de serotipos en la formulación tetravalente para lograr una respuesta de anticuerpos equilibrada, lo que se destaca por el reciente fracaso del virus quimérico vivo atenuado tetravalente más avanzado para proporcionar protección clínicamente significativa en un gran ensayo de fase 2B en Tailandia (Sabchareon A, y otros, 2012). Se cree que la interferencia viral contribuye al fracaso ya que uno o más serotipos del virus son más competitivos que los otros. Los virus quiméricos DENV-1/3 y DENV-3/1 son virus individuales que presentan epítomos reconocidos por anticuerpos neutralizantes de los individuos inmunes a DENV-1 y DENV-3. Esto indica que los virus individuales deberían ser capaces de inducir anticuerpos neutralizantes dirigidos a dos serotipos a la vez, reemplazando dos virus (DENV-1 y 3) con un virus (DENV-1/3 o DENV-3/1).

20 K. Raviprakash y otros, (Virology 353 (2006) páginas 166-173) se refieren a una vacuna quimérica tetravalente de ADN contra el dengue que induce anticuerpos neutralizantes para los cuatro serotipos del virus en macacos rhesus. H. Bielefeldt-Ohmann y otros, (Journal of General Virology (1997) volumen 78, páginas 2723-2733) se refieren al análisis de una proteína de envoltura híbrida recombinante del virus dengue-2-virus dengue-3 expresada en un sistema secretor de baculovirus. El documento WO 2013/151764 se refiere a composiciones y métodos de uso de una glicoproteína E del virus del dengue quimérico que comprende la cadena principal de la glicoproteína E del virus del dengue, la cual comprende sustituciones de aminoácidos que introducen una bisagra en los dominios I y II de la glicoproteína E de un serotipo del virus del dengue que es diferente del serotipo de la cadena principal de la glicoproteína E.

40 Breve descripción de las figuras

Figuras 1A-B. Para el mutante DENV-1/3, la bisagra EDI-II de DENV3 se trasplantó en un fondo DENV-1, WestPac'74, creando un mutante de bisagra DENV-3/1. La bisagra EDI-II se definió usando el mAb 5J7 específico de humano contra DENV3. A) El virus resultante, rDENV-1/3, se probó contra el anticuerpo monoclonal 5J7. Esta figura muestra que DENV-1 no se neutraliza por 5J7, a diferencia de DENV-3. El virus rDENV-1/3, que solo contiene la bisagra EDI/II de DENV-3 se neutraliza con 5J7 a concentraciones equivalentes a las concentraciones neutralizantes de DENV-3. Esto demuestra un trasplante exitoso del epítomo 5J7 en DENV-1. B) Este panel muestra que DENV-3 no se neutraliza por mAb 1F4, DENV-1 se neutraliza por 1F4 y rDENV-1/3 también, lo que indica que 1F4 todavía puede unirse y neutralizar el virus quimérico.

50 Figuras 2A-B. Estas figuras muestran los sueros inmunes humanos primarios a DENV-1 y DENV-3 probados contra DENV-1, DENV-3 y la bisagra WestPac-3001 del virus quimérico de bisagra (rDENV-1/3). El eje Y muestra una dilución doble de los sueros inmunes necesarios para neutralizar el 50 % de la entrada del virus en el cultivo de tejidos. Los valores más altos indican un suero más potente. A) Los sueros primarios inmunes a DENV-1 neutralizan potentemente el DENV-1 pero no el DENV-3. El virus rDENV-1/3 es sensible a la neutralización de los sueros inmunes a DENV-1 a concentraciones similares a la de DENV-1, lo que indica que, a diferencia del virus DENV-3 parental, el virus quimérico muestra epítomos reconocidos por los sueros inmunes a DENV-1. B) Los sueros primarios inmunes a DENV-3 no neutralizan el DENV-1 pero neutralizan el DENV-3. El virus rDENV-1/3 se neutraliza por los sueros inmunes primarios a DENV-3 a concentraciones similares a las de DENV-3, lo que indica que el virus quimérico rDENV-1/3 conserva los epítomos críticos de DENV-3 que son dianas de los anticuerpos a DENV-3 en sueros humanos inmunes a DENV-3 . * indica no neutralizado.

60 Figura 3. Esta figura muestra que la bisagra WestPac'74 3001 induce anticuerpos ampliamente neutralizantes cruzados a los 28, 60, 90, 120 y 180 días después de la infección en macacos rhesus. El eje Y muestra un título de anticuerpos neutralizantes como el anterior. El eje X muestra cada serotipo del virus. Cada punto trazado es el título neutralizante para un solo macaco rhesus contra un serotipo dado. La línea central a través de cada grupo de puntos es el título neutralizante de la media geométrica para cada grupo de macacos contra cada serotipo. Los bigotes muestran el error estándar de la

media. Cada punto de tiempo (28, 30, 60, 90, 120, 180 días) muestra la respuesta de anticuerpos ampliamente neutralizantes cruzados contra los cuatro serotipos.

5 Figuras 4A-B. Para los mutantes DENV-3/1, la bisagra EDI-II definida por la marca del anticuerpo monoclonal 1F4 de DENV1 (WestPac '74) se trasplantó en un contexto de DENV-3 (3001) creando un mutante de bisagra DENV-1/3. Este trasplante se ejecutó para tres virus diferentes (1F4S, 1F4R y 1F4E), y cada variante representa una región de epítipo más grande. La bisagra EDI-II de rDENV-3 se colocó en un virus rDENV-1 recombinante. Esta figura muestra los datos del ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) con la unión relativa del anticuerpo por la densidad óptica (OD) en el eje Y y el aumento de la concentración de anticuerpos en el eje X. A) Unión del mAb 1F4 a 3001-1F4S, R y E. La curva ascendente contra el virus quimérico muestra la unión del anticuerpo, en contraste con el 3001 parental, que no se une al mAb 1F4. B) Unión de mAb 5J7 a los parentales 3001, 3001-1F4S, R y E. La unión de 5J7 se conserva en estos virus, mientras que el donante de epítipos icWestPac '74 no se une a 5J7.

15 Figuras 5A-B. Estas figuras muestran los sueros primarios humanos inmunes a DENV-1 y DENV-3 probados contra DENV-1, DENV-3 y el virus quimérico de bisagra 3001-1F4E. El eje Y muestra una dilución doble de los sueros inmunes necesarios para neutralizar el 50 % de la entrada del virus en el cultivo de tejidos. Los valores más altos indican un suero más potente. A) Los sueros primarios inmunes a DENV-1 neutralizan potentemente el DENV-1 pero no el DENV-3. El virus 3001 1F4E es sensible a la neutralización de los sueros inmunes a DENV-1 a concentraciones similares a las de DENV-1, lo que indica que, a diferencia del virus DENV-3 parental, el virus quimérico muestra epítipos reconocidos por los sueros inmunes a DENV-1. B) Los sueros primarios inmunes a DENV-3 no neutralizan DENV-1 pero neutralizan DENV-3. El virus 3001 1F4E se neutraliza por los sueros primarios inmunes a DENV-3 a concentraciones similares a las de DENV-3, lo que indica que el virus quimérico 3001-1F4E conserva los epítipos críticos de DENV-3 que son dianas de los anticuerpos a DENV-3 en los sueros humanos inmunes a DENV-3.

25 Figura 6. Inmunogenicidad del virus 3001-1F4E en macacos rhesus. Solo se proporciona un punto de tiempo, que muestra anticuerpos ampliamente neutralizantes cruzados, consistente con lo que se encontró para la bisagra WestPac-3001.

Resumen de la invención

30 La presente invención proporciona una glicoproteína E del virus del dengue quimérico que comprende una cadena principal de la glicoproteína E del virus del dengue que comprende sustituciones de aminoácidos que introducen un epítipo que es reconocido por un anticuerpo reactivo a un serotipo del virus del dengue que es diferente del serotipo de la cadena principal de la glicoproteína E; en donde la glicoproteína E del virus del dengue quimérico comprende la secuencia de aminoácidos:

35 MRCVGI~~GN~~RDFVEGLSGATWVDVVLEHGSCVTTMAKDKPTLDI~~ELL~~KTE**ATQL**ATLRKLC
IEAKISNTTTDSRCPTQGEATLV~~EE~~QDTNFVCRRTFVDRGWNGCGLFGKGS~~LIT~~CAKFK
CVTK**IEGKVV**QYENLKYSVIVTVHTGDQH~~QV~~GN~~ET~~TEHGT**I**ATI~~TP~~QAPTSEI~~QL~~TDYGA
40 LTLDCSPRTGLDFNEM**ILLTMKNKAW**MVHRQWFLDLPLPWTSGASTSQETWNRQDLLVTF
KTAHAKKQEVVVLGSQEGAMHTALTGATEIQNS**GGTS**IFAGHLKCR~~LK~~MDKLTLLKGM~~SY~~
MCTGSFKLEKEVAETQHGTVLVQVKYEGTDAPCKIPFSSQDEKGVTQNGRLITANPIVTD
KEKPNVIEAEPFPGESYIVVGAGEKALKLSWFKKG

45 o la secuencia de aminoácidos:

50 MRCVGI~~GN~~RDFVEGLSGATWVDVVLEHGCVTTMAKNKPTLDI~~EL~~**FKTEVTNP**AVLRKLCIEGK
ITNITTSRCPTQGEAVLPEEQDQNYVCKHTYVDRGWNGCGLFGKGS~~LV~~TCAKFQCLEPIEGK
VVQYENLKYS**SVIV**TVHTGDQH~~QV~~GN~~ET~~**TEHGTI**ATI~~TP~~QAPTSEI~~QL~~**TDYGA**LGLECS~~PRT~~GLD
FNEMILLTMKNKAWMVHRQWFLDLPLPWTSGATTETPTWNRKELLVTFKNAHAKKQEVVVLGSQ
EGAMHTALTGATEIQ**TS**GT**TT**IFAGHLKCR~~LK~~MDKLELKGMSYAMC~~TNT~~FVLKKEVSETQHGTI
55 LIKVEYKGEDAPCKIPFSTEDGQKAHNGRLITANPVVTKKEE~~PN~~IEAEPFPGESNIVIGIGD
NALKINWYKKG

Además, en la presente descripción se proporciona una partícula de flavivirus o una partícula similar a virus (VLP) que comprende la glicoproteína E de esta invención.

60 También se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica para la glicoproteína E de esta invención, así como una molécula de ácido nucleico aislada que codifica para la partícula de flavivirus o la VLP de esta invención.

La presente invención también proporciona una composición que comprende la glicoproteína E de esta invención en un portador farmacéuticamente aceptable, y proporciona una composición que comprende la molécula de ácido nucleico de esta invención en un portador farmacéuticamente aceptable.

Además, la presente invención proporciona la glicoproteína E, la partícula de flavivirus, la molécula de ácido nucleico y/o la composición de esta invención y cualquier combinación de las mismas para su uso en la producción de una respuesta inmunitaria al virus del dengue en un sujeto.

5 La presente invención también proporciona la glicoproteína E, la partícula de flavivirus, la molécula de ácido nucleico y/o la composición de esta invención y cualquier combinación de las mismas para su uso en el tratamiento de una infección por el virus del dengue en un sujeto.

10 Además, en la presente invención se proporciona la glicoproteína E, la partícula de flavivirus, la molécula de ácido nucleico y/o la composición de esta invención y cualquier combinación de las mismas para su uso en la prevención de una infección por el virus del dengue en un sujeto (por ejemplo, un sujeto que lo necesite).

15 En la presente descripción también se proporciona la glicoproteína E, la partícula de flavivirus, la molécula de ácido nucleico y/o la composición de esta invención y cualquier combinación de las mismas para su uso en la protección de un sujeto (por ejemplo, un sujeto que lo necesite) de los efectos de una infección por el virus del dengue.

Descripción detallada de la invención

20 La presente invención se basa en el descubrimiento inesperado de que las regiones del epítipo que definen un serotipo de DENV pueden transferirse a una cadena principal de proteínas de un serotipo de DENV diferente para crear una molécula quimérica que contiene dianas de anticuerpos para ambos serotipos, funcionando así como una vacuna bivalente que puede inducir anticuerpos neutralizantes contra dos serotipos de DENV diferentes de una sola fuente. Por lo tanto, en la presente invención se describe una plataforma para la construcción de una cadena principal de glicoproteína E del virus del dengue quimérico que comprende sustituciones de aminoácidos que introducen epítopos reconocidos por un anticuerpo reactivo a un serotipo del virus del dengue diferente del serotipo de la cadena principal de la glicoproteína E.

30 En algunas modalidades, esa cadena principal de la glicoproteína E del virus del dengue es del serotipo 1 del virus del dengue. En algunas modalidades, la cadena principal de la glicoproteína E puede ser del serotipo 2, del serotipo 3 o del serotipo 4 del virus del dengue.

35 En algunas modalidades, el anticuerpo que es reactivo a un serotipo del virus del dengue diferente del serotipo de la cadena principal de la glicoproteína E, es un anticuerpo reactivo al serotipo 3 del virus del dengue. Un ejemplo no limitante de dicho anticuerpo es el anticuerpo monoclonal 5J7.

En otras modalidades, el anticuerpo que es reactivo con un serotipo del virus del dengue diferente del serotipo de la cadena principal de la glicoproteína E, es un anticuerpo reactivo al serotipo 1, al serotipo 2 o al serotipo 4 del virus del dengue .

40 Debe entenderse que cualquier combinación de un primer serotipo del virus del dengue para la cadena principal de la glicoproteína E y un segundo serotipo que es la diana del anticuerpo que reconoce el epítipo introducido en el cadena principal de la glicoproteína E puede usarse, siempre que el primer y el segundo serotipo del virus del dengue sean diferentes (es decir, no sean el mismo serotipo).

45 En algunas modalidades, la glicoproteína E del virus del dengue quimérico de esta invención puede comprender, consistir esencialmente o consistir en la secuencia de aminoácidos:

Bisagra WestPac74-3001 (rDENV-1/3)

50 MRCVGI~~GN~~RDFVEGLSGATWVDVVLEHGSCVTTMAKDKPTLDI~~ELL~~KTE**ATQLAT**LRKLC
IEAKISNTTTDSRCPTQGEATLVEEQDTNFVCRRTFVDRGWGNGCGLFGKGS~~LIT~~CAKFK
CVTK**I**EGK**V**VQYENLKYSVIVTVHTGDQHQVGN**T**TEHG**T**IATITPQAPTSEIQ**L**TDYGA
LTLDCSPRTGLDFNEM**I**LLTM**KNKAWM**VHRQWFLDLPLPWTSGASTSQETWNRQDLLVTF
55 KTAHAKKQEVVVLGSQEGAMHTALTGATEIQ**NSG**G**T**SIFAGHLKCR**L**KMDK**L**TLKGMSYV
MCTGSFKLEKEVAETQHGTVLVQVKYEGTDAPCKIPFSSQDEKGV**T**QNGRLITANPIVTD
KEKPVNIEAEPF**G**ESYIVVGAGEKALKLSWFKKG.

60 En algunas modalidades, la glicoproteína E del virus del dengue quimérico de esta invención puede comprender, consistir esencialmente o consistir en la secuencia de aminoácidos:

3001-1F4E (rDENV-3/1)

65

5 MRCVGI~~GNRDFVEGL~~SGATWVDV~~VLEHGGCVTTMAKNKPTLDIEL~~**FKTEVTNP**AVLRKLCIEGK
 ITNIT~~TD SRCPTQGEAVLPEEQDQNYVCKHTYVDRGWGNGCGLFGKGS~~LVTC**AKFQCLEPIEGK**
 VVQYENLKY**SVIV**TVHTGDQH**QVGN**ET**TEHGTI**ATIT**PQAPTSEIQ**LDY**GALGLECS**PRTGLD
 FNEMILLTMKNKAWMVHRQWFFDLPLPWTSGATTETPTWNRKELLVTFKNAHAKKQEVVVLGSQ
 EGAMHTALTGATEIQ**TS**G**TTT**IFAGHLK**CRLKMDKLELKGMSYAMCTNTFVLKKEV**SETQHGTI
 10 LIKVEYKGEDAPCKIPFSTEDGQKAHNGRLITANPVVTKKEE**PVNI**EAEPPFGESNIVIGIGD
 NALKINWYKKG

15 La presente invención también proporciona una partícula de flavivirus o una partícula similar a virus (VLP) que comprende la glicoproteína E quimérica de esta invención.

20 La producción de las proteínas quiméricas se puede llevar a cabo introduciendo algunas (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, etc.) o todas las sustituciones de aminoácidos identificadas en la Tabla 1 en una cadena principal de glicoproteína E del virus del dengue o una cadena principal de la glicoproteína E de flavivirus. Para producir una proteína quimérica no se requiere que todos los aminoácidos identificados en la Tabla 1 sean sustituidos. Por ejemplo, en algunas modalidades, se pueden incluir en la producción sustituciones adicionales y/u omisión de sustituciones de aproximadamente 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos en cualquier extremo de las secuencias de aminoácidos contiguas identificadas en la Tabla 1 como las regiones de epítomos respectivos de una proteína quimérica. El número de sustituciones necesarias para producir el epítomo conformacional deseado puede determinarlo fácilmente un experto en la técnica de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención y con protocolos bien conocidos en la técnica. La numeración de la posición de aminoácidos en la Tabla 1 se basa en la secuencia de aminoácidos de WestPac74 (DENV-1), o la secuencia de aminoácidos de UNC 3001 (DENV-3), como se proporciona en la presente invención. Sin embargo, un experto en la técnica entenderá fácilmente que las posiciones de aminoácidos equivalentes en otras secuencias de aminoácidos de la glicoproteína E del virus del dengue u otras secuencias de aminoácidos de la glicoproteína E de flavivirus pueden identificarse fácilmente y emplearse en la producción de las proteínas quiméricas de esta invención.

30 La Tabla 2 muestra un ejemplo de modificaciones que se pueden hacer a la secuencia de nucleótidos que codifica para la glicoproteína E de DENV-1 para introducir el epítomo que reconoce el anticuerpo monoclonal 5J7, que es reactivo a DENV-3. La secuencia de aminoácidos que resulta de la traducción de una secuencia de nucleótidos que comprende estas sustituciones es:

35 MRCVGI~~GNRDFVEGL~~SGATWVDV~~VLEH~~SGCVTTMAKDKPTLDI**ELLKTEATQL**ATLRKLC
 IEAKISNTTTD**SRCPTQGEATLVEEQD**TNFVCRRTFVDRGWGNGCGLFGKGS**LITCAKFK**
 CVTK**IEGKVV**QYENLKY**SVIV**TVHTGDQH**QVGN**ET**TEHGTI**ATIT**PQAPTSEIQ**LDYGA
 LTLDCSPRTGLDFNEM**ILLTMKNKAWM**VHRQWFFDLPLPWTSGAST**SQETWNRQDLLVTF**
 KTAHAKKQEVVVLGSQEGAMHTALTGATEIQ**NSGGTS**IFAGHLK**CRLKMDKLT**LGMSYV
 MCTGSFKLEKEVAETQHGTVLVQVKYEGTDAPCKIPFSSQDEKGVTQNGRLITANPIVTD
 KEKPVNIEAEPPFGESYIVVGAGEKALKLSWFKKG.

40 Se entenderá que las modificaciones proporcionadas en la Tabla 2 proporcionan un ejemplo de cómo se puede obtener la secuencia de aminoácidos anterior y que, debido a la degeneración de los codones de aminoácidos, se pueden realizar otras numerosas modificaciones a la secuencia de nucleótidos que codifica para la glicoproteína el E del DENV-3 para obtener esta secuencia de aminoácidos.

45 La Tabla 3 muestra que la bisagra WestPac'74 3001 es infecciosa en macacos rhesus infectados por vía subcutánea con 500,000 unidades infecciosas de virus. Los valores que se informan para cada día son los logaritmos de los títulos virales en sueros de monos transformados, cuantificado por ensayos de inmunofoco.

50 Tabla 4. Atenuación de 3001-1F4E en macacos rhesus. Esta tabla muestra que 3001-1F4E es infecciosa en macacos rhesus infectados por vía subcutánea con 500,000 unidades infecciosas de virus. *Sin embargo*, este virus estaba por debajo del nivel de detección cuantitativo (50 virus infecciosos/ml de suero). Un ensayo más sensible, el ensayo de foco retardado, es capaz de detectar virus <50 unidades infecciosas/ml, pero no es capaz de cuantificar el nivel bajo de virus presente. En consecuencia, los días para los que se detectó el virus mediante nuestro ensayo más sensible se anotan como positivos con "+". El número total de días infectados se muestra en la columna izquierda. El nivel bajo de viremia y el número medio bajo de días infectados (2.25 días) son consistentes con la atenuación del virus en macacos.

55 Tabla 5. Para caracterizar aún más el virus quimérico DENV 1/3, se marcó con el anticuerpo monoclonal 1F4, específico a DENV-1. El anticuerpo monoclonal 1F4 es específico a un serotipo y su epítomo diana está en la bisagra EDI-II. Si la bisagra EDI-II de DENV-3 trasplantada altera el epítomo 1F4, éste ya no debería neutralizar el virus quimérico WestPac74/3001.

- En algunas modalidades, la presente descripción proporciona una glicoproteína E quimérica de flavivirus en la que se realizan sustituciones de aminoácidos para introducir un epítipo del virus del dengue en una glicoproteína E de un flavivirus diferente al virus del dengue. Por lo tanto, en algunas modalidades, la presente descripción proporciona una glicoproteína E de flavivirus que comprende una glicoproteína E quimérica con una cadena principal de glicoproteína E de flavivirus diferente a la cadena principal de la glicoproteína E del virus del dengue, en la que la cadena principal de glicoproteína E de flavivirus comprende sustitutos de aminoácidos que introducen un epítipo reconocido por un anticuerpo reactivo con un virus del dengue.
- Los ejemplos no limitantes de flavivirus que se pueden usar incluyen el virus de la fiebre amarilla (YFV) (por ejemplo, Acceso a la Base de Datos del GenBank® No. JX503529), virus de la encefalitis japonesa (JEV) (por ejemplo, Acceso a la Base de Datos del GenBank® No. U14163), virus del Nilo Occidental (WNV) (por ejemplo, Acceso a la Base de Datos del GenBank® No. DQ211652) y cualquier otro flavivirus que se conozca en la actualidad o que se identifique posteriormente.
- Se sabe en la técnica que muchos intentos de producir vacunas contra el virus del dengue dan como resultado la producción de anticuerpos no neutralizantes, lo que puede aumentar la probabilidad de patología tras la exposición posterior a la infección natural o la vacuna. Otro enfoque para proporcionar un epítipo diseñado es administrar la totalidad o una parte de la proteína E del virus del dengue incorporada en otra partícula de flavivirus o VLP. En modalidades representativas de esta descripción, los flavivirus heterólogos son el virus del Nilo Occidental o el virus de la fiebre amarilla. Algunas porciones de la proteína E pueden injertarse en la proteína E de la cadena principal de los flavivirus heterólogos, *por ejemplo*, para reducir la generación de anticuerpos no neutralizantes contra el virus del dengue a epítipos no neutralizantes presentes en la proteína E del virus del dengue y/u otras proteínas estructurales del virus del dengue.
- Por lo tanto, un flavivirus quimérico o un VLP de flavivirus quimérico puede presentar el epítipo del virus del dengue cuaternario en una conformación adecuada mientras reduce la generación de anticuerpos no neutralizantes a otras porciones de la proteína E del virus del dengue y/u otras proteínas estructurales que están presentes en el flavivirus quimérico o el VLP de flavivirus quimérico.
- En algunas modalidades, los epítipos individuales y conformacionales de la glicoproteína E del flavivirus E o la glicoproteína E del virus del dengue pueden presentarse en una estructura principal o estructura de soporte sintética para que los epítipos dentro de la estructura principal o estructura de soporte imiten la conformación y disposición de los epítipos dentro del estructura de la glicoproteína E, partícula viral o VLP.
- En otras modalidades adicionales, la presente descripción proporciona mimitopos de péptidos (ver, Meloen y otros. (2000) J. Mol. Recognit. 13, 352-359) que imitan los epítipos individuales y conformacionales de las glicoproteínas E de la invención. Los mimitopos se pueden identificar usando cualquier método conocido en la técnica, tales como la estimulación de superficie, las bibliotecas de péptidos aleatorios o las bibliotecas de presentación en fagos, usando un anticuerpo o anticuerpos para los epítipos individuales y conformacionales de las glicoproteínas E de la invención.
- La descripción proporciona además un ácido nucleico (*por ejemplo*, un ácido nucleico aislado) que codifica un epítipo del virus del dengue o un polipéptido de la invención.
- La descripción proporciona además un ácido nucleico (*por ejemplo*, un ácido nucleico aislado) que codifica un VLP de flavivirus quimérico o una partícula de flavivirus quimérico (por ejemplo, una envoltura viral de la partícula de flavivirus) de la invención.
- También se proporcionan vectores que codifican los ácidos nucleicos de la invención.
- También se proporcionan células que comprenden los vectores, ácidos nucleicos, epítipos del virus del dengue, polipéptidos, VLP de flavivirus quiméricos o partículas de flavivirus quiméricos de la invención.
- La invención proporciona además composiciones inmunogénicas que comprenden las células, vectores, ácidos nucleicos, epítipos del virus del dengue, polipéptidos, VLP de flavivirus quimérico o partículas de flavivirus quimérico de la invención.
- En modalidades, la composición inmunogénica es monovalente. En modalidades, la composición inmunogénica es multivalente (*por ejemplo*, tetravalente) para los serotipos DEN1, DEN2, DEN 3 y/o DEN4 del virus del dengue.
- En la presente descripción se describen los métodos para producir una respuesta inmunitaria a un virus del dengue en un sujeto, el método comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un epítipo del virus del dengue, un polipéptido, un VLP de flavivirus quimérico o una partícula de flavivirus quimérico, ácido nucleico, vector, célula o inmunogénico .
- Además, la presente invención proporciona la glicoproteína E de la invención, la partícula de flavivirus de la invención, el ácido nucleico de la invención y/o la composición de la invención para su uso en la producción de una respuesta inmunitaria a un virus del dengue en un sujeto. La respuesta inmunitaria puede ser contra uno, dos, tres o los cuatro DEN1, DEN2, DEN3 y DEN4. Se conoce bien en la técnica que las vacunas contra el dengue multivalentes eficaces y seguras han sido un desafío en su diseño debido al problema de la interferencia entre los serotipos. Por ejemplo, la

respuesta inmunitaria puede estar dirigida principalmente contra algunos de los serotipos diana. Se requieren múltiples vacunas para tratar de lograr una respuesta contra todos los serotipos; sin embargo, en el caso del virus del dengue, este enfoque puede ser peligroso porque las administraciones repetidas a un sujeto con anticuerpos preexistentes pueden provocar la fiebre hemorrágica del dengue.

Un aspecto adicional de la invención es una glicoproteína E de la invención, la glicoproteína E de la invención, la partícula de flavivirus de la invención, el ácido nucleico de la invención y/o la composición de la invención para su uso en el tratamiento o la prevención de una infección por el virus del dengue en un sujeto o para proteger a un sujeto de los efectos de la infección por el virus del dengue.

Existen cuatro serotipos del virus del dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4). Dentro de cada serotipo hay varias cepas o genotipos diferentes. Los antígenos y epítomos del virus del dengue pueden derivarse de cualquier virus del dengue, incluidos todos los serotipos, cepas y genotipos que se conocen en la actualidad o los que se identifiquen posteriormente.

En modalidades de la descripción, el virus del dengue es la cepa UNC1017 (DEN1), la cepa West Pacific 74 (DEN1), la cepa S16803 (DEN2), la cepa UNC2005 (DEN2), la cepa UNC3001 (DEN3), UNC3043 (cepa de DEN3 059.AP-2 de Filipinas, 1984), la cepa UNC3009 (DEN3, D2863, Sri Lanka 1989), UNC3066 (DEN3, cepa 1342 de Puerto Rico 1977), la cepa CH53489 (DEN3), la cepa UNC4019 (DEN4) o TVP-360 (DEN4).

En modalidades de la descripción, un "fragmento inmunogénicamente activo" de un polipéptido del virus del dengue (*por ejemplo*, la proteína E) comprende, consiste esencialmente en o consiste en al menos aproximadamente 6, 8, 10, 12, 15, 20, 30, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 o más aminoácidos, opcionalmente aminoácidos contiguos, y/o menos de aproximadamente 495, 475, 450, 425, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 75 o 50 aminoácidos, opcionalmente aminoácidos contiguos, incluyendo cualquier combinación de lo anterior siempre que el límite inferior sea menor que el límite superior, y el "fragmento inmunogénicamente activo" induzca una respuesta inmunitaria (*por ejemplo*, IgG y/o IgA que reaccione con el antígeno nativo), opcionalmente una respuesta inmunitaria protectora, contra el virus del dengue en un hospedero e induzca la producción de anticuerpos que se unan específicamente al epítomo del virus del dengue cuaternario recientemente identificado por los inventores.

El término "epítomo" como se usa en la presente descripción significa una secuencia de aminoácidos específica que, cuando está presente en la conformación adecuada, proporciona un sitio reactivo para un anticuerpo (*por ejemplo*, un epítomo de células B) o un receptor de células T (*por ejemplo*, un epítomo de células T).

Las porciones de un polipéptido dado que incluyen un epítomo de células B pueden identificarse mediante el uso de cualquiera de las técnicas de mapeo de epítomos que se conocen en la técnica. (*Ver, por ejemplo*, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed., 1996, Humana Press, Totowa, N.J.). Por ejemplo, se pueden determinar epítomos lineales mediante, *por ejemplo*, la síntesis simultánea de grandes números de péptidos sobre soportes sólidos, los péptidos correspondientes a porciones de la molécula de proteína, y mediante la reacción de los péptidos con anticuerpos mientras los péptidos todavía están unidos a los soportes. Dichas técnicas se conocen en la técnica y se describen en, *por ejemplo*, la patente de Estados Unidos No 4,708,871; Geysen y otros. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002; Geysen y otros. (1986) Molec. Immunol. 23:709-715.

De manera similar, los epítomos se identifican fácilmente mediante la determinación de la conformación espacial de aminoácidos tales como, *por ejemplo*, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Las regiones antigénicas de las proteínas también pueden identificarse mediante el uso de gráficos estándares de antigenicidad e hidropatía, *por ejemplo*, la versión 1.0 del software Omega comercializado por Oxford Molecular Group. Este programa de ordenador emplea el método Hopp/Woods (Hopp y otros., Proc. Natl. Acad. Sci USA (1981) 78:3824-3828) para determinar los perfiles de antigenicidad y la técnica Kyte-Doolittle (Kyte y otros., J. Mol. Biol. (1982) 157:105-132) para los gráficos de hidropatía.

Generalmente, los epítomos de células T que participan en la estimulación del grupo celular del sistema inmune de un sujeto son péptidos cortos de aproximadamente 8-25 aminoácidos. Una forma común de identificar los epítomos de células T es usar péptidos sintéticos superpuestos y analizar grupos de estos péptidos, o los individuales, que se reconocen por las células T de animales inmunes al antígeno de interés, mediante el uso, por ejemplo, de un ensayo de Inmunospot ligado a enzimas (ELISPOT). Estos péptidos superpuestos también pueden usarse en otros ensayos, como la estimulación de la liberación o secreción de citoquinas, o evaluarse mediante la construcción de tetrámeros de histocompatibilidad mayor (MHC) que contienen el péptido. Estos fragmentos inmunogénicamente activos también pueden identificarse en función de su capacidad para estimular la proliferación de linfocitos en respuesta a la estimulación por diversos fragmentos del antígeno de interés.

La presente descripción se puede poner en práctica con fines profilácticos, terapéuticos y/o diagnósticos. Además, la descripción se puede poner en práctica para producir anticuerpos para cualquier propósito, como el diagnóstico o la investigación, o para la inmunización pasiva mediante transferencia a otro sujeto.

- La presente invención proporciona además un estuche que comprende una o más composiciones de esta invención. Un experto en la técnica entenderá bien que el estuche de esta invención puede comprender uno o más recipientes y/o receptáculos para contener los reactivos (por ejemplo, anticuerpos, antígenos, ácidos nucleicos) del estuche, junto con tampones y/o diluyentes y/u otras soluciones e instrucciones para usar el estuche, como se conoce bien en la técnica.
- Estos estuches pueden comprender además adyuvantes y/u otros agentes inmunoestimuladores o inmunomoduladores, como se conoce bien en la técnica.
- Las composiciones y estuches de la presente invención también pueden incluir otros agentes medicinales, agentes farmacéuticos, portadores, diluyentes, citocinas inmunoestimuladoras, etc. Los métodos actuales para preparar esas formas de dosificación se conocen, o resultarán evidentes, para los expertos en esta técnica.
- La administración a un sujeto puede ser por cualquier ruta conocida en la técnica. Como ejemplos no limitantes, la ruta de administración puede ser por inhalación (*por ejemplo*, inhalación oral y/o nasal), oral, bucal (*por ejemplo*, sublingual), rectal, vaginal, tópica (incluida la administración en las vías respiratorias), intraocular, transdérmica, por vía parenteral (*por ejemplo*, intramuscular [*por ejemplo*, la administración al músculo esquelético], vías intravenosa, intraarterial, intraperitoneal y similares), subcutánea (incluida la administración en la planta del pie), vías intradérmica, intrapleural, intracerebral y/o intratecal.
- Los epítomos, polipéptidos, VLP y vectores virales de la invención pueden administrarse *per se* o suministrando un ácido nucleico (*por ejemplo*, ADN) que codifica lo mismo.
- Los compuestos inmunomoduladores, tales como quimiocinas y citocinas inmunomoduladoras (preferentemente, citocinas inductoras de CTL) pueden administrarse simultáneamente a un sujeto.
- Las citocinas pueden administrarse por cualquier método conocido en la técnica. Las citocinas exógenas pueden administrarse al sujeto, o alternativamente, una secuencia de ácido nucleico que codifica una citocina puede suministrarse al sujeto usando un vector adecuado, y la citocina producida *in vivo*. En modalidades particulares, un adyuvante viral expresa la citocina.
- En modalidades, dosis múltiples (*por ejemplo*, dos, tres o más) de una composición de la invención pueden administrarse sin patogenicidad detectable (*por ejemplo*, Síndrome de Choque por Dengue/Fiebre Hemorrágica del Dengue).
- En modalidades de la invención, las vacunas multivalentes de la invención no dan como resultado interferencia inmune, *por ejemplo*, se induce una respuesta inmunitaria equilibrada contra todos los antígenos presentados. En modalidades de la invención, la respuesta equilibrada resulta en una inmunidad protectora contra DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4.
- En modalidades de la invención, la vacuna multivalente puede formularse para la administración a un sujeto que tiene presente anticuerpos maternos contra el dengue.
- Debe apreciarse que esta invención puede realizarse de formas diferentes y no debe interpretarse como limitada a las modalidades expuestas en la presente descripción. Estas modalidades más bien se proporcionan para que la descripción sea exhaustiva y completa, y refleje completamente el alcance de la invención a los expertos en la técnica.
- A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. La terminología que se usa en la descripción de la invención en la presente descripción es con el propósito de describir modalidades particulares y no se pretende que sean limitantes de la invención.
- Como se usa en la presente descripción, "un", "una", "el" o "la" pueden significar uno o más de uno. Por ejemplo, "una" célula puede significar una sola célula o una multiplicidad de células.
- Además, como se usa en la presente descripción, "y/o" se refiere y abarca a todas y cada una de las combinaciones posibles de uno o más de los elementos enumerados asociados, así como la falta de combinaciones cuando se interpreta en la alternativa ("o").
- El término "aproximadamente", como se usa en la presente descripción cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad de dosis (*por ejemplo*, una cantidad de ácido graso) y similares, se entiende que abarca variaciones de $\pm 20\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0.5\%$, o incluso $\pm 0,1\%$ de la cantidad especificada.
- Como se usa en la presente descripción, la frase de transición "que consiste esencialmente en" significa que el alcance de una reivindicación debe interpretarse para que abarque los materiales o etapas especificadas en la reivindicación, "y aquellos que no afectan materialmente la(s) característica(s) básica(s) y novedosa(s)" de la invención reivindicada. *Ver, In re Herz*, 537 F.2d 549, 551-52, 190 U.S.P.Q. 461, 463 (CCPA 1976) (énfasis en el original); *ver además* MPEP § 2111,03. Por lo tanto, el término "que consiste esencialmente en" cuando se usa en una reivindicación de esta invención no pretende interpretarse como equivalente a "que comprende".

- 5 Como se usa en la presente descripción, el término "ácido nucleico" abarca tanto ARN como ADN, incluyendo ADNc, ADN genómico, sintético (*por ejemplo*, ADN sintetizado químicamente) y ARN y ADN quiméricos. El ácido nucleico puede ser bicatenario o monocatenario. El ácido nucleico puede sintetizarse usando análogos de nucleótidos o derivados (*por ejemplo*, nucleótidos de inosina o fosforotioato). Tales nucleótidos se pueden usar, *por ejemplo*, para preparar ácidos nucleicos que tienen la capacidad de emparejamiento de bases alteradas o mayor resistencia a las nucleasas.
- 10 Como se usa en la presente descripción, el término "polipéptido" abarca los péptidos y proteínas, (incluyendo las proteínas de fusión) a menos que se indique lo contrario.
- 15 Una "proteína de fusión" es un polipéptido producido cuando dos secuencias de nucleótidos heterólogas o fragmentos de las mismas que codifican para dos (o más) polipéptidos diferentes que no se encuentran fusionados en la naturaleza, se fusionan en el marco de lectura correcto de la traducción.
- Un ácido nucleico "recombinante", polinucleótido o secuencia de nucleótidos es uno producido por técnicas de ingeniería genética.
- Un polipéptido "recombinante" se produce a partir de un ácido nucleico, polipéptido o secuencia de nucleótidos recombinante.
- 20 Como se usa en la presente descripción, un polinucleótido "aislado" (*por ejemplo*, un "ácido nucleico aislado" o una "secuencia de nucleótidos aislada") significa un polinucleótido al menos parcialmente separado de al menos algunos de los otros componentes del organismo o virus natural, *por ejemplo*, los componentes estructurales celulares o virales u otros polipéptidos o ácidos nucleicos comúnmente encontrados asociados con el polinucleótido. Opcionalmente, pero no necesariamente, el polinucleótido "aislado" está presente en una concentración mayor (*es decir*, está enriquecido) en comparación con el material de partida (*por ejemplo*, al menos aproximadamente dos veces, tres veces, cuatro veces, diez veces, veinte veces, cincuenta veces, cien veces, quinientos veces, mil veces, diez mil veces o una mayor concentración). En modalidades representativas, el polinucleótido aislado es al menos aproximadamente 1 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más puro.
- 25 Un polipéptido "aislado" significa un polipéptido que está al menos parcialmente separado de al menos algunos de los otros componentes del organismo o virus natural, *por ejemplo*, los componentes estructurales celulares o virales u otros polipéptidos o ácidos nucleicos comúnmente encontrados asociados con el polipéptido. Opcionalmente, pero no necesariamente, el polipéptido "aislado" está presente en una concentración mayor (*es decir*, está enriquecido) en comparación con el material de partida (*por ejemplo*, al menos aproximadamente dos veces, tres veces, cuatro veces, diez veces, veinte veces, cincuenta veces, cien veces, quinientos veces, mil veces, diez mil veces o una mayor concentración). En modalidades representativas, el polipéptido aislado es al menos aproximadamente 1 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más puro.
- 30 Además, una célula "aislada" es aquella que se ha separado parcial o completamente de otros componentes con los que normalmente se asocia en la naturaleza. *Por ejemplo*, una célula aislada puede ser una célula en un medio de cultivo y/o una célula en un portador farmacéuticamente aceptable.
- 35 Los términos "inmunógeno" y "antígeno" se usan indistintamente en la presente descripción y significan cualquier compuesto (incluidos los polipéptidos) a los que se puede dirigir una respuesta inmunitaria celular y/o humoral. En modalidades particulares, un inmunógeno o antígeno puede inducir una respuesta inmunitaria protectora contra los efectos de la infección por el virus del dengue.
- 40 Una "cantidad efectiva" como se usa en la presente descripción se refiere a una cantidad de un vector, ácido nucleico, epítipo, polipéptido, célula, partícula, VLP, composición o formulación de la invención que es suficiente para producir un efecto deseado, que puede ser un efecto terapéutico y/o beneficioso. La cantidad efectiva variará con la edad, la condición general del sujeto, la gravedad de la afección a tratar, el agente particular administrado, la duración del tratamiento, la naturaleza de cualquier tratamiento concurrente, el portador farmacéuticamente aceptable usado y factores similares dentro del conocimiento y la experiencia de los expertos en la técnica. Una "cantidad efectiva" apropiada en cualquier caso individual puede determinarse por un experto en la técnica por referencia a los textos y la literatura pertinentes y/o mediante el uso en experimentación de rutina.
- 45 El término "cantidad inmunogénica" o "dosis inmunizante efectiva", como se usa en la presente descripción, a menos que se indique lo contrario, significa una cantidad o dosis suficiente para inducir una respuesta inmunitaria (que opcionalmente puede ser una respuesta protectora) en el sujeto tratado, que es mayor que la inmunidad inherente de los sujetos no inmunizados. Una cantidad inmunogénica o una dosis inmunizante efectiva en cualquier contexto particular puede determinarse rutinariamente usando métodos conocidos en la técnica.
- 50 Los términos "vacuna", "vacunación" e "inmunización" se conocen bien en la técnica, y se usan indistintamente en la presente descripción. *Por ejemplo*, los términos vacuna, vacunación o inmunización pueden entenderse como un proceso o composición que aumenta la reacción inmune de un sujeto a un inmunógeno (*por ejemplo*, proporcionando una
- 55

respuesta inmunitaria activa) y, por lo tanto, su capacidad para resistir, superar y/o recuperarse de una infección (es decir, una respuesta inmunitaria protectora).

Por los términos "tratar", o "tratamiento de" (y las variaciones gramaticales de los mismos) se entiende que la gravedad de la afección del sujeto se reduce, al menos mejora o se alivia parcialmente, y/o que se logra algún alivio, mitigación o disminución en al menos un síntoma clínico y/o hay un retraso en la progresión de la enfermedad o el trastorno. En modalidades representativas, los términos "tratar", o "tratamiento de" (y las variaciones gramaticales de los mismos) se refieren a una reducción en la gravedad de la viremia y/o un retraso en la progresión de la viremia, con o sin otros signos de enfermedad clínica.

Una cantidad "efectiva para el tratamiento" como se usa en la presente descripción es una cantidad suficiente para tratar (como se define en la presente descripción) al sujeto. Aquellos con experiencia en la técnica apreciarán que los efectos terapéuticos no necesitan ser completos o curativos, siempre y cuando algún beneficio se proporciona al sujeto.

El término "prevenir", o "prevención de" (y las variaciones gramaticales de los mismos) se refieren a la prevención y/o el retraso del inicio y/o la progresión de una enfermedad, trastorno y/o los síntomas clínicos en un sujeto y/o una reducción en la severidad del inicio y/o la progresión de la enfermedad, trastorno y/o síntoma(s) clínico(s) en relación con lo que ocurriría en ausencia de los métodos de la invención. En modalidades representativas, los términos "prevenir", o "prevención de" (y las variaciones gramaticales de los mismos) se refieren a la prevención y/o retraso del inicio y/o la progresión de la viremia en el sujeto, con o sin otros signos de enfermedad clínica. La prevención puede ser completa, *por ejemplo*, la ausencia total de la enfermedad, trastorno y/o síntoma(s) clínico(s). La prevención también puede ser parcial, de manera que la aparición de la enfermedad, trastorno y/o los síntomas clínicos en el sujeto y/o la gravedad del inicio y/o la progresión es menor de lo que ocurriría en ausencia de la presente invención.

Una cantidad "efectiva de prevención" como se usa en la presente descripción es una cantidad suficiente para prevenir (como se define en la presente descripción) la enfermedad, trastorno y/o síntoma clínico en el sujeto. Aquellos con experiencia en la técnica apreciarán que los niveles de prevención no necesitan ser completos o curativos, siempre y cuando algún beneficio se proporciona al sujeto.

La eficacia del tratamiento y/o la prevención de la infección por el virus del dengue por los métodos de la presente invención se puede determinar mediante la detección de una mejoría clínica como lo indica un cambio en los síntomas y/o parámetros clínicos del sujeto (*por ejemplo*, viremia), como bien sabría un experto en la técnica.

A menos que se indique lo contrario, los términos "proteger", "protegiendo", "protección" y "protector" (y sus variaciones gramaticales) abarcan los métodos para prevenir y tratar la infección por el virus del dengue en un sujeto, ya sea contra una o múltiples cepas, genotipos o serotipos del virus del dengue.

Los términos respuesta inmunitaria "protectora" o inmunidad "protectora" tal como se usan en la presente descripción indican que la respuesta inmunitaria confiere algún beneficio al sujeto en el sentido de que previene o reduce la incidencia y/o gravedad y/o la duración de la enfermedad o cualquier otra manifestación de infección. Por ejemplo, en modalidades representativas, una respuesta inmunitaria protectora o inmunidad protectora da como resultado una viremia reducida, acompañada o no de enfermedad clínica. Alternativamente, una respuesta inmunitaria protectora o inmunidad protectora puede ser útil en el tratamiento terapéutico de la enfermedad existente.

Una "respuesta inmunitaria activa" o "inmunidad activa" se caracteriza por la "participación de células y tejidos del huésped después de un encuentro con el inmunógeno. Implica la diferenciación y proliferación de células inmunocompetentes en los tejidos linforeticulares, lo que conduce a la síntesis de anticuerpos o al desarrollo de reactividad mediada por células, o ambas". Herbert B. Herscovitz, Immunophysiology: Cell Function and Cellular Interactions in Antibody Formation, en IMMUNOLOGY: BASIC PROCESSES 117 (Joseph A. Bellanti ed., 1985). Alternativamente, el huésped desarrolla una respuesta inmunitaria activa después de la exposición a inmunógenos por infección o por vacunación. La inmunidad activa puede contrastarse con la inmunidad pasiva, la cual se adquiere a través de la "transferencia de sustancias preformadas (anticuerpo, factor de transferencia, injerto tímico, interleucina-2) de un hospedero inmunizado activamente a un huésped no inmune". *Id.*

Un "sujeto" de la invención incluye cualquier animal susceptible a la infección por el virus del dengue. Este sujeto es generalmente un mamífero (*por ejemplo*, un animal de laboratorio como una rata, ratón, conejillo de indias, conejo, primates, etc.), un animal de granja o comercial (*por ejemplo*, una vaca, caballo, cabra, burro, oveja, etc.), o un animal doméstico (*por ejemplo*, gato, perro, hurón, etc.). En modalidades particulares, el sujeto es un primate, un primate no humano (*por ejemplo*, un chimpancé, babuino, mono, gorila, etc.) o un humano. Los sujetos de la invención puede ser un sujeto que se conozca o se crea que está en riesgo de infección por el virus del dengue. Alternativamente, un sujeto de acuerdo con la invención también puede incluir un sujeto que no se no se conozca previamente o se sospeche de estar infectado por el virus del dengue, o que necesite tratamiento para la infección por el virus del dengue.

Los sujetos pueden tratarse para cualquier propósito, tal como para provocar una respuesta inmunitaria protectora o para provocar la producción de anticuerpos en ese sujeto, los cuales se pueden recolectar y usar para otros fines, como puede ser fines de investigación o diagnóstico o para administrar a otros sujetos y producir inmunidad pasiva en los mismos, etc.

Los sujetos incluyen hombres y/o mujeres de cualquier edad, incluidos los recién nacidos, jóvenes, maduros y geriátricos. Con respecto a sujetos humanos, en modalidades representativas, el sujeto puede ser un bebé (*por ejemplo*, menos de aproximadamente 12 meses, 10 meses, 9 meses, 8 meses, 7 meses, 6 meses o menos), un niño pequeño (*por ejemplo*, al menos aproximadamente 12, 18 o 24 meses y/o menos aproximadamente 36, 30 o 24 meses), o un niño (*por ejemplo*, de al menos 1, 2, 3, 4 o 5 años de edad aproximadamente y/o menos aproximadamente 14, 12, 10, 8, 7, 6, 5 o 4 años de edad). En las modalidades de la invención, el sujeto es un humano que tiene aproximadamente de 0 a 3, 4, 5, 6, 9, 12, 15, 18, 24, 30, 36, 48 o 60 meses de edad, o de aproximadamente 3 a los 6, 9, 12, 15, 18, 24, 30, 36, 48 o 60 meses de edad, o de aproximadamente 6 a 9, 12, 15, 18, 24, 30, 36, 48 o 60 meses de edad, de aproximadamente 9 a 12, 15, 18, 24, 30, 36, 48 o 60 meses de edad, o de aproximadamente 12 a 18, 24, 36, 48 o 60 meses de edad, o de aproximadamente 18 a 24, 30, 36, 48 o 60 meses de edad, o de aproximadamente 24 a 30, 36, 48 o 60 meses de edad.

En modalidades de la invención, el sujeto tiene anticuerpos maternos contra el virus del dengue.

Un "sujeto necesitado" de los métodos de la invención puede ser un sujeto que se conozca o se sospeche que está infectado o en riesgo de infectarse con el virus del dengue.

También se proporcionan formulaciones farmacéuticas (*por ejemplo*, una formulación inmunogénica) que comprende los epítomos del virus del dengue, polipéptidos, VLP de flavivirus quimérico o partículas de flavivirus quiméricas, ácidos nucleicos, vectores, células o composiciones de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable, y puede formularse para la administración en un portador farmacéutico de acuerdo con las técnicas conocidas. *Ver, por ejemplo*, Remington, The Science and Practice of Pharmacy (última edición). En la fabricación de una composición farmacéutica de acuerdo con las modalidades de la presente invención, la composición de la invención se mezcla típicamente con, *entre otros*, un portador farmacéuticamente aceptable. Por "portador farmacéuticamente aceptable" se entiende un portador que es compatible con otros ingredientes en la composición farmacéutica y que no es perjudicial o nocivo para el sujeto. El portador puede ser un sólido o un líquido, o ambos, y puede formularse preferentemente con la composición de la invención como una formulación de dosis unitaria, por ejemplo, una tableta, la cual puede contener de aproximadamente 0.01 a 0.5 % a aproximadamente de 95 % a 99% en peso de la composición. Las composiciones farmacéuticas se preparan por cualquiera de las técnicas de farmacia bien conocidas, incluyendo, pero sin limitarse a, la mezcla de los componentes, incluyendo opcionalmente uno o más ingredientes secundarios. En ciertas modalidades, el portador farmacéuticamente aceptable es estéril y se consideraría adecuado para la administración a sujetos humanos de acuerdo con las directrices reguladoras para composiciones farmacéuticas que comprende el portador.

Además, un componente "farmacéuticamente aceptable" tal como una sal, portador, excipiente o diluyente de una composición de acuerdo con la presente invención es un componente que (i) es compatible con los otros ingredientes de la composición ya que puede combinarse con las composiciones de la presente invención sin hacer que la composición sea inadecuada para su propósito pretendido, y (ii) es adecuada para su uso con sujetos como se proporciona en la presente descripción sin efectos secundarios adversos excesivos (tales como toxicidad, irritación y respuesta alérgica). Los efectos secundarios son "excesivos" cuando su riesgo supera el beneficio proporcionado por la composición. Los ejemplos no limitantes de componentes farmacéuticamente aceptables incluyen cualquiera de los portadores farmacéuticos estándares tales como soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones tales como emulsión de aceite/agua, microemulsiones, y varios tipos de agentes humectantes.

En algunas modalidades, las composiciones de la invención pueden comprender además uno o más de un adyuvante. Los adyuvantes de la presente invención pueden estar en forma de una secuencia de aminoácidos y/o en forma de un ácido nucleico que codifica para un adyuvante. Cuando está en forma de un ácido nucleico, el adyuvante puede ser un componente de un ácido nucleico que codifica el(los) polipéptido(s) o fragmento(s) o epítipo(s) y/o un componente separado de la composición que comprende el ácido nucleico que codifica para el(los) polipéptido(s) o fragmento(s) o epítipo(s) de la invención. De acuerdo con la presente invención, el adyuvante también puede ser una secuencia de aminoácidos que es un péptido, un fragmento de proteína o una proteína completa que funciona como un adyuvante, y/o el adyuvante puede ser un ácido nucleico que codifica para un péptido, fragmento de proteína o proteína completa que funciona como un adyuvante. Como se usa en la presente descripción, "adyuvante" describe una sustancia, que puede ser cualquier sustancia inmunomoduladora capaz de combinarse con una composición de la invención para potenciar, mejorar o de otra manera modular una respuesta inmunitaria en un sujeto.

En modalidades adicionales, el adyuvante puede ser, pero sin limitarse a, una citocina inmunoestimuladora (que incluye, pero sin limitarse a, GM-CSF, interleucina-2, interleucina-12, interferón-gamma, interleucina-4, factor de necrosis tumoral-alfa, interleucina-1, factor hematopoyético flt3L, CD40L, moléculas coestimuladoras B7.1 y B7.2), formulación adyuvante SYNTEX 1 (SAF-1) compuesta de 5 por ciento (peso/volumen) de escualeno (DASF, Parsippany, N.J.), 2.5 por ciento de Pluronic, el polímero L121 (Aldrich Chemical, Milwaukee) y 0.2 por ciento de polisorbato (Tween 80, Sigma) en solución salina tamponada con fosfato. Los adyuvantes adecuados también incluyen una sal de aluminio tal como gel de hidróxido de aluminio (alum), fosfato de aluminio o algannmulin, pero también puede ser una sal de calcio, hierro o zinc, o puede ser una suspensión insoluble de tirosina acilada o azúcares acilados catiónicamente o polisacáridos aniónicamente derivados, o polifosfacenos.

- Otros adyuvantes adecuados se conocen bien en la técnica e incluyen sin limitación MF 59, LT-K63, LT-R72 (Pal y otros., Vaccine 24(6):766-75 (2005)), QS-21, adyuvante de Freund (completo e incompleto), hidróxido de aluminio, N-acetil-muramyl-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramyl-L-alanil-D-isoglutamina (CGP 11637, mencionado como nor-MDP), N-acetilmuramyl-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-e-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxisforiloxi)-etilamina (CGP 19835A, mencionado como MTP-PE) y RIBI, que contiene tres componentes extraídos de bacteria, monofosforil lípido A, trealosa dimicolato y la cadena principal de la pared celular (MPL+TDM+CWS) en 2 % de emulsión de escualeno/Tween 80.
- Los adyuvantes adicionales pueden incluir, por ejemplo, una combinación de monofosforil lípido A, preferentemente monofosforil 3-de-O-acilado lípido A (3D-MPL) junto con una sal de aluminio. Un sistema adyuvante mejorado implica la combinación de un monofosforil lípido A y un derivado de saponina, particularmente la combinación de QS21 y 3D-MPL como se describe en la publicación PCT número WO 94/00153, o una composición menos reactogénica donde el QS21 se inactiva con el colesterol como se describe en la publicación PCT número WO 96/33739. Una formulación adyuvante particularmente potente que involucra QS21 3D-MPL y tocoferol en una emulsión de aceite en agua se describe en la publicación PCT número WO 95/17210. Además, las composiciones de ácido nucleico de la invención pueden incluir un adyuvante al comprender una secuencia de nucleótidos que codifica el antígeno y una secuencia de nucleótidos que proporciona una función adyuvante, tal como las secuencias de CpG. Estas secuencias de CpG, o motivos, se conocen bien en la técnica.
- Un adyuvante para su uso con la presente invención, tal como, por ejemplo, una citocina inmunoestimuladora, se puede administrar antes, simultáneamente con y/o dentro de unas pocas horas, varias horas, y/o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y/o 10 días antes y/o después de la administración de una composición de la invención a un sujeto.
- Además, cualquier combinación de adyuvantes, tales como las citocinas inmunoestimuladoras, se pueden administrar conjuntamente al sujeto antes, después y/o simultáneamente con la administración de una composición inmunogénica de la invención. Por ejemplo, las combinaciones de citocinas inmunoestimuladoras pueden consistir en dos o más citocinas inmunoestimuladoras, como GM-CSF, interleucina-2, interleucina-12, interferón-gamma, interleucina-4, factor de necrosis tumoral-alfa, interleucina-1, factor hematopoyético flt3L, CD40L, y moléculas coestimuladoras B7.1 y B7.2. La efectividad de un adyuvante o combinación de adyuvantes puede determinarse midiendo la respuesta inmunitaria producida en respuesta a la administración de una composición de esta invención a un sujeto con y sin el adyuvante o una combinación de adyuvantes, usando procedimientos estándares, como se describe en la presente descripción y como se conoce en la técnica.
- En modalidades de la invención, el adyuvante comprende un adyuvante de alfavirus como se describe, por ejemplo en el documento US 7,862,829.
- Las dosis de refuerzo pueden administrarse adicionalmente a lo largo de días, semanas, meses o años. En la infección crónica, las dosis altas iniciales seguidas de dosis de refuerzo pueden ser ventajosas.
- Las formulaciones farmacéuticas de la invención pueden comprender opcionalmente otros agentes medicinales, farmacéuticos, agentes estabilizadores, tampones, portadores, diluyentes, sales, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes y similares, por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina, etc.
- Para una inyección, el portador será típicamente un líquido. Para otros métodos de administración, el portador puede ser sólido o líquido. Para la administración por inhalación, el portador será respirable, y típicamente está en forma de partículas sólidas o líquidas.
- Las composiciones de la invención se pueden formular para su administración en un portador farmacéutico de acuerdo con técnicas conocidas. Ver, por ejemplo, Remington, The Science and Practice of Pharmacy (9na Ed. 1995). En la preparación de una composición farmacéutica de acuerdo con la invención, las VLP se mezclan típicamente con, entre otros, un portador aceptable. El portador puede ser un sólido o un líquido, o ambos, y se formula opcionalmente con el compuesto como una formulación de dosis unitaria, por ejemplo, una tableta. Se puede usar una variedad de portadores acuosos farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, agua, agua tamponada, solución salina al 0.9 %, glicina al 0.3 %, ácido hialurónico, agua libre de pirógenos, solución salina tamponada con fosfato libre de pirógenos, agua bacteriostática o Cremophor EL[R] (BASF, Parsippany, N.J.), y similares. Estas composiciones pueden esterilizarse mediante técnicas convencionales. Las formulaciones de la invención pueden prepararse mediante cualquiera de las técnicas de farmacia bien conocidas.
- Las formulaciones farmacéuticas pueden envasarse para su uso tal cual, o liofilizarse, la preparación liofilizada generalmente se combina con una solución acuosa estéril antes de la administración. Las composiciones pueden envasarse además en envases de dosis únicas o multidosis, por ejemplo, en ampollas y viales sellados.
- Las formulaciones farmacéuticas pueden formularse para la administración por cualquier método conocido en la técnica de acuerdo con técnicas convencionales de farmacia. Por ejemplo, las composiciones pueden formularse para administrarse por vía intranasal, por inhalación (*por ejemplo*, inhalación oral), oral, bucal (*por ejemplo*, por vía sublingual),

rectal, vaginal, tópica, intratecal, intraocular, transdérmica, por administración parenteral (*por ejemplo*, intramuscular [*por ejemplo*, músculo esquelético], intravenoso, subcutáneo, intradérmico, intrapleural, intracerebral e intraarterial, intratecal) o tópicamente (*por ejemplo*, tanto en la piel como en las superficies mucosas, incluidas las superficies de las vías respiratorias).

5 Para la administración intranasal o por inhalación, la formulación farmacéutica puede formularse como un aerosol (este término incluye tanto aerosoles líquidos como polvo seco). Por ejemplo, la formulación farmacéutica puede proporcionarse en una forma finamente dividida junto con un surfactante y un propulsor. Los porcentajes típicos de la composición son 0.01-20 % en peso, preferentemente 1-10 %. El surfactante es generalmente no tóxico y soluble en el propulsor. Los compuestos representativos de estos agentes son los ésteres o ésteres parciales de ácidos grasos que contienen de 6 a 22 átomos de carbono, como los ácidos caproico, octanoico, láurico, palmítico, esteárico, linoleico, linolénico, olestérico y oleico, con un alcohol polihídrico alifático o su anhídrido cíclico. Se pueden emplear ésteres mixtos, tales como glicéridos mixtos o naturales. El surfactante puede constituir 0.1-20 % en peso de la composición, preferentemente 0.25-5 %. El equilibrio de la composición es normalmente el propulsor. Si se desea, también se puede incluir un portador, tal como con lecitina para administración intranasal. Los aerosoles de partículas líquidas pueden producirse por cualquier medio adecuado, tal como con un nebulizador de aerosol impulsado por presión o un nebulizador ultrasónico, como conocen los expertos en la técnica. *Ver, por ejemplo*, la patente de los Estados Unidos No. 4,501,729. Los aerosoles de partículas sólidas pueden producirse igualmente con cualquier generador de aerosol de medicamento particulado sólido, por técnicas conocidas en la industria farmacéutica. La administración intranasal también puede ser por la administración de gotas en una superficie nasal.

Las formulaciones inyectables pueden prepararse en formas convencionales como soluciones líquidas o suspensiones, como formas sólidas adecuadas para una solución o suspensión en el líquido previo a la inyección, o como emulsiones. Alternativamente, las formulaciones farmacéuticas pueden administrarse de manera local en lugar de una manera sistémica, por ejemplo, en una formulación de liberación sostenida o de depósito.

Las soluciones y suspensiones de inyección extemporáneas pueden prepararse a partir de polvos, gránulos y tabletas estériles del tipo descrito anteriormente. Por ejemplo, puede proporcionarse una formulación estéril inyectable, estable de la invención en una forma de dosificación unitaria en un recipiente sellado. La formulación puede proporcionarse en forma de un liofilizado, el cual es capaz de reconstituirse con un portador adecuado farmacéuticamente aceptable para formar una composición líquida adecuada para inyectar en un sujeto. La forma de dosificación unitaria puede ser de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 10 gramos de la formulación. Cuando la formulación es sustancialmente insoluble en agua, se puede incluir un agente emulsionante, que es farmacéuticamente aceptable, en una cantidad suficiente para emulsionar la formulación en un portador acuoso. Uno de los agentes emulsionantes útiles es la fosfatidilcolina.

Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para la administración por vía oral pueden presentarse en unidades discretas, tales como cápsulas, sellos para medicamentos, pastillas, o tabletas, en forma de polvo o gránulos; como una solución o suspensión en un líquido acuoso o no acuoso; o como una emulsión de aceite en agua o de agua en aceite. El suministro oral se puede realizar formando un complejo de uno o más compuestos de la presente invención en un portador capaz de resistir la degradación por enzimas digestivas en el intestino de un animal. Los ejemplos de estos portadores incluyen las cápsulas o tabletas de plástico, como se conoce en la técnica. Estas formulaciones pueden prepararse por cualquier método adecuado de farmacia que incluya la etapa de asociar las proteínas y un portador adecuado (que puede contener uno o más ingredientes auxiliares como se señaló anteriormente). En general, las formulaciones farmacéuticas se preparan mediante un mezclado uniforme e intrínseco del(los) compuesto(s) con un portador líquido o sólido finamente dividido, o ambos, y después si es necesario, la conformación de la mezcla resultante. Por ejemplo, una tableta puede prepararse mediante compresión o moldeo de un polvo o gránulos, opcionalmente con uno o más ingredientes auxiliares. Las tabletas comprimidas se preparan por compresión, en una máquina adecuada, la formulación en una forma de flujo libre, tal como un polvo o gránulos mezclados opcionalmente con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, y/o agente(s) activo(s) de superficie/dispersantes. Las tabletas moldeadas se fabrican mediante moldeo, en una máquina adecuada, de la proteína en polvo humedecida con un aglutinante líquido inerte.

Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para la administración bucal (sublingual) incluyen pastillas que comprenden el(los) compuesto(s) en una base saborizada, usualmente sacarosa y acacia o tragacanto; y pastillas en una base inerte tal como gelatina y glicerina o sacarosa y acacia.

Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para la administración parenteral comprenden soluciones para inyección acuosas y no acuosas estériles, cuyas preparaciones son preferentemente isotónicas con la sangre del receptor indicado. Estas preparaciones pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos, las cuales hacen la composición isotónica con la sangre del receptor indicado. Las suspensiones, soluciones y emulsiones estériles acuosas y no acuosas pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Los ejemplos de solventes no acuosos son el propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tal como oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, que incluyen una solución salina y medios tamponados. Los portadores parenterales incluyen solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, lactato de Ringer y aceites fijos. Los portadores intravenosos incluyen reponedores de fluidos y nutrientes, reponedores de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer), y similares. También

pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, y gases inertes y similares.

5 Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para la administración rectal se presentan opcionalmente como supositorios de dosis unitaria. Estas pueden prepararse mediante la mezcla del agente activo con uno o más portadores sólidos convencionales, tal como por ejemplo, manteca de cacao, y después conformar la mezcla resultante.

10 Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para la aplicación tópica en la piel tienen preferentemente la forma de un ungüento, crema, loción, pasta, gel, atomizador, aerosol, o aceite. Los portadores que pueden usarse incluyen, entre otros, vaselina, lanolina, polietilenglicoles, alcoholes, potenciadores transdérmicos, y las combinaciones de dos o más de estos. En algunas modalidades, por ejemplo, la administración tópica se puede realizar mezclando una formulación farmacéutica de la presente invención con un reactivo lipofílico (por ejemplo, DMSO) que es capaz de atravesar la piel.

15 Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para la administración transdérmica pueden presentarse en forma de parches discretos que se adaptan para mantenerse en contacto estrecho con la epidermis del sujeto durante un período de tiempo prolongado. Las formulaciones adecuadas para la administración transdérmica pueden suministrarse, además, por iontoforesis (ver, por ejemplo, Pharmaceutical Research 3:318 (1986)) y adoptarán típicamente la forma de una solución acuosa tamponada del (los) compuesto(s). Las formulaciones adecuadas pueden comprender tampón de citrato o bis/tris (pH 6) o etanol/agua y contienen de 0.1 a 0.2M de ingrediente activo.

20 En modalidades de la invención, la dosificación de una partícula viral de esta invención puede estar en el intervalo de aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^7 unidades formadoras de placas (PFU). En modalidades de esta invención, la dosificación de una VLP de esta invención puede estar en un intervalo de 500 microgramos a aproximadamente 5 miligramos. En modalidades de esta invención, la dosificación de una proteína de esta invención puede estar en el intervalo de 10^0 a aproximadamente 10^4 microgramos +/- adyuvante.

30 Además, la composición puede formularse como una formulación liposomal. La capa lipídica empleada puede ser de cualquier composición convencional y puede contener o no colesterol. Los liposomas que se producen pueden reducirse en tamaño, por ejemplo, mediante el uso de técnicas estándares de sonicación y homogeneización.

Las formulaciones liposomales pueden liofilizarse para producir un liofilizado que puede reconstituirse con un portador farmacéuticamente aceptable, como agua, para regenerar una suspensión liposomal.

35 Las formulaciones inmunogénicas de la invención pueden ser opcionalmente estériles, y pueden proporcionarse además en un recipiente cerrado impermeable a los patógenos.

EJEMPLOS

40 La biología sintética ofrece un control genético incomparable sobre la estructura del genoma, la expresión y la organización de los genomas virales. El complejo del virus del dengue (DENV) consta de cuatro virus estrechamente relacionados designados como serotipos de DENV 1-4, que son antigénicamente similares pero inducen patrones complejos de neutralización reactiva cruzada y potencian las respuestas de anticuerpos en poblaciones humanas. Para estudiar las relaciones antigénicas entre los serotipos de DENV, se describe la construcción y caracterización de un panel de clones moleculares de DENV1-4 estables y virus recombinantes basados en aislamientos clínicos de bajo pase. Los virus recombinantes se replicaron como los virus de tipo salvaje y se codificaron para mutaciones marcadoras apropiadas. Para evaluar el papel de la variación natural en DENV3, se realizaron cuatro construcciones isogénicas diseñadas sintéticamente reemplazando el gen de la glicoproteína (E) de la envoltura original por genes E basados en los cuatro genotipos genética y geográficamente distintos de DENV-3. Los virus recombinantes fueron viables, evaluados para el crecimiento en insectos y mamíferos huésped, y las pruebas de neutralización monoclonal y policlonal demostraron que la microvariación natural entre la neutralización de DEN3 influye en los patrones de susceptibilidad de neutralización cruzada. Para evaluar el uso de la tecnología de ADN recombinante para mapear epítopos definidos, se usaron mutaciones de escape y mapeo de epítopos para mapear las coordenadas de varios epítopos. Luego, se intercambiaron estos epítopos entre las cepas. Los virus recombinantes fueron viables y los ensayos de ganancia y pérdida de función con sueros monoclonales y policlonales revelaron patrones antigénicos que revelan consideraciones importantes en el diseño de la vacuna.

55 El anticuerpo monoclonal humano (mAb) 5J7 contra el virus dengue (DENV) neutraliza potentemente el serotipo 3 de DENV (DENV-3) uniéndose a un epítipo en la glicoproteína de la envoltura (E) de DENV-3. Este epítipo abarca la región E conocida como la bisagra del dominio E I-II (EDI-II). Al usar una plataforma de clones de infección por DENV, el epítipo de DENV-3 5J7 se trasplantó en una glicoproteína E del serotipo 1 de DENV (DENV-1). Este trasplante hace que el virus DENV-1/3 recombinante sea sensible a la neutralización por mAb 5J7. Significativamente, el trasplante no interrumpe la estructura antigénica nativa de DENV-1, y el virus recombinante es sensible a los sueros policlonales humanos de DENV-1 y DENV-3. Esta sensibilidad indica que la glicoproteína E quimérica de DENV-1/3 puede funcionar como una vacuna bivalente capaz de inducir anticuerpos neutralizantes contra dos serotipos de virus: DENV-1 y DENV-3.

65

Lo anterior es ilustrativo de la presente invención, y no debe interpretarse como una limitante de esta. La invención se define mediante las siguientes reivindicaciones

5

Tabla 1. Sustituciones de aminoácidos para producir DENV-1/3 y DENV-3/1

E.AA #	50	52	53	125	129	161	197	202	203	205	207	210	272	275	277						
WestPac'74	V	N	P	V	L	I	T	V	E	K	W	L	K	T	T						
DENV-1/3	A	Q	L	I	V	I	I	K	N	A	M	R	N	G	S						
	bisagra																				
E.AA #	46	50	52	53	138	141	155	156	157	160	163	169	171	173	174	176	177	180	272	275	277
3001	Q	A	Q	L	T	I	T	-	-	V	E	S	T	A	I	P	E	T	N	G	S
Denv-3/1	L	V	N	P	S	V	V	T	E	T	T	P	S	I	Q	T	D	A	T	T	T

ES 2 745 431 T3

Tabla 2. Sustituciones de nucleótidos en DCS de WestPac'74 (DENV-1) para producir la bisagra DENV 1-3

5	Posición nt.	1083	1087	1088	1090	1092	1093	1096	1097	1098	1102
	WestPac'74	T	A	A	C	C	T	C	G	T	G
	Bisagra DENV-1/3	C	C	C	A	T	G	G	A	C	A
10	Posición nt.	1103	1105	1108	1111	1307	1309	1311	1318	1319	1321
	WestPac'74	C	C	A	G	C	G	A	G	A	A
	Bisagra DENV-1/3	A	G	G	A	A	A	G	A	G	G
15	Posición nt.	1324	1416	1510	1513	1519	1523	1525	2528	2529	1531
	WestPac'74	C	C	C	T	G	G	G	G	T	G
20	Bisagra DENV-1/3	G	T	T	C	A	A	C	A	C	A
25	nt. Posición	1538	1543	1547	1553	1555	1558	1561	1563	1724	1729
	WestPac'74	G	A	T	C	C	C	C	A	T	T
	Bisagra DENV-1/3	A	C	G	A	G	A	T	G	C	A
30	Posición nt.	1735	1749	1750	1753	1757	1758	1759	1764	1765	1774
	WestPac'74	G	C	G	T	A	C	G	C	A	A
	Bisagra DENV-1/3	C	A	C	A	G	G	C	G	C	G

35 Tabla 3.

Viremia (Log FFU/mL)													
RM	Reto	Día	Día	Día	Día	Día	Día	Día	Día	Día	Día	Días	
40	I.D.	Virus	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	viremia
	BM05		-	2.0	-	2.1	1.7	2.4	-	1.4	-	-	5
	BP34	rDENV1/3	-	-	1.7	-	2.1	2.4	1.9	-	-	-	4
45	BP73		-	1.7	-	2.0	1.9	2.6	1.4	-	-	-	5
	BS69		-	2.3	1.9	2.0	2.4	-	2.1	-	-	-	5

50 Tabla 4.

Viremia (Log FFU/mL)													
RM	Reto	Día	Día	Día	Día	Día	Día	Día	Día	Día	Día	Días	
55	I.D.	Virus	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	viremia
	OL3		-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	4
	3J6	3001-F4E	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	3
60	8K2		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	1
	7L2		-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	1

65

Tabla 5.

	Mabs	Donante	Unión al virus	Unión a la proteína				Neut50 (µg/ml)	
				rE	EDI II	DV1	DV2	DV3	DV4
5	1B19	HD184	Complejo	+	-	1.2	1.8	2.9	5.7
	1B22	HD184	Complejo	-	-	>10	>10	>10	>10
10	1B23	19	Complejo	+	+	7.7	9.77	3.1	18.6
	1C6	Harris Aguda	Complejo	-	-	>10	>10	1.55	>10
	10000	HD184	Complejo	+	+	1.1	1	3.4	4
15	1F4	HD184	DENV-1	-	-	0.11	>10	>10	>10
	1F16.2	Harris Aguda	Complejo	+	+	3.93	5	12	20.9
	1G10	Harris Aguda	Complejo	+	-	>10	>10	0.093	>10
20	1H10	HD184	Complejo	-	-	>10	>10	0.37	4.3
	1H16	Harris Aguda	Complejo	-	-	>10	>10	>10	>10
	1112	HD184	Complejo	-	-	>10	>10	0.36	>10
25	1L6	HD184	Complejo	+	-	2.34	6.7	1.1	6.25
	1L13	Vacuna	Complejo	-	-	>10	>10	0.24	>10
	1M19	19	Complejo	+	-	4.6	6.7	0.28	5.9
30	1N5	Harris Aguda	Complejo	+	-	0.27	.04	0.98	0.85
	1N8	HD184	Complejo	+	-	4.5	4.1	7.65	5.95
	2M11	HD184	Complejo	+	-	1.72	2.62	3.61	4.36
35	3B4	HD184	Complejo	+	-	1.77	2.23	1.26	1.61
	5C8	HD184	Complejo	+	-	1.07	1.65	0.95	3.31
	5J7	105	Complejo	-	-	>10	>10	0.09	>10
40	5K17	HD184	Complejo	+	-	2.28	3.16	6.21	4.71

Secuencias

Secuencia de aminoácidos de UNC 3001 (DENV-3)

45 MRCVGIGNRDFVEGLSGATWVDVVLHGGCVTTMAKNKPTLDIELQKTEATQLATLRKLC
 IEGKITNITTD SRCPTQGEAVLPEEQDQNYVCKHTYVDRGWGNGCGLFGKGS�VTCAKFQ
 CLEPIEGKVVQYENLKYTVIITVHTGDQHVGNETQGVTAIIT--PQASTTEAILPEYGT
 50 LGLECSPTGLDFNEMILLTMKNKAWMVHRQWFFDLPLPWTSGATTETPTWNRKELLVTF
 KNAHAKKQEVVVLGSQEGAMHTALTGATEIQNSGGTSIFAGHLKCR LKMDKLELKGMSYA
 MCTNTFVLKKEVSETQHGTILIKVEYKGEDAPCKIPFSTEDGQGAHNGRLITANPVVTK
 KEEPVNIEAEPFPGESNIVIGIGDNALKINWYKKG

55 Secuencia de aminoácidos de WestPac74 (DENV-1)

MRCVGIGNRDFVEGLSGATWVDVVLHGGCVTTMAKDKPTLDIELLKTEVTNPAVLRKLC
 IEAKISNTTTD SRCPTQGEATLVEEQDTNFVCRRTFVDRGWGNGCGLFGKGS�ITCAKFK
 CVTKLEGKIVQYENLKYSVIIVTVHTGDQHVGNETTEHGTTATITPQAPTSEIQLDYGA
 60 LTLDCSPRTGLDFNEMVLLTMEKKSWLVHKQWFFDLPLPWTSGASTSQETWNRQDLLVTF
 KTAHAKKQEVVVLGSQEGAMHTALTGATEIQTSGTTTIFAGHLKCR LKMDKLT LKGMSYV
 MCTGSFKLEKEVAETQHGTVLVQVKYEGTDAPCKIPFSSQDEKGVTONGRLITANPIVTD
 65 KEKPNIEAEPFPGESYIVVGAGEKALKLSWFKKG

Secuencia de aminoácidos de la bisagra de WestPac74 (DENV 1/3)

5 MRCVGI^NRDFVEGLSGATWVDV^VLEHGSCVTTMAKDKPTLDIELLKTE^AT^QL^AT^LLRKLC
 IEAKISNTTTDSRCPTQGEATLVEEQDTNFVCRRTFVDRGWGNGCGLFGKGS^LITCAKFK
 CVTK^IEGK^VVQYENLKYSVIVTVHTGDQHQVGN^ETT^EHGT^IATITPQAPTSEIQLTDYGA
 10 LTLDCSPRTGLDFNEM^ILLTM^KNK^AW^MVHRQWFLDLPLPWTSGASTSQETWNRQDLLVTF
 KTAHAKKQEVVVLGSQEGAMHTALTGATEIQ^NSG^GTSIFAGHLKCR^LKMDKLT^LKGMSYV
 MCTGSFKLEKEVAETQHGTVLVQVKYEGTDAPCKIPFSSQDEKGV^TQNGRLITANPIVTD
 KEKPVNIEAEP^PFGESYIVVGAGEKALKLSWFKKG

15 Secuencia de aminoácidos de 3001-1F4E (DENV 3/1)

MRCVGI^NRDFVEGLSGATWVDV^VLEHGGCVTTMAKNKPTLDIEL^FKTE^VT^NP^AV^LRKLCIEGK
 ITNITTTDSRCPTQGEAVLPEEQDQNYVCKHTYVDRGWGNGCGLFGKGS^LVTCAKFQCLEPIEGK
 VVQYENLKYS^SVIVTVHTGDQHQVGN^ETT^EHGT^IATITPQAPTSEI^QL^TDYGA^LGLECSPRTGLD
 20 FNEMILLTMKNKAWMVHRQWFFDLPLPWTSGATTETPTWNRKELLVTFKNAHAKKQEVVVLGSQ
 EGAMHTALTGATEIQ^TSG^TTTIFAGHLKCR^LKMDKLELKGMSYAMCTNTFVLKKEVSETQHGTI
 LIKVEYKGEDAPCKIPFSTEDGQGAHN^GRLITANPVVTKKEE^PVNIEAEP^PFGESNIVIGIGD
 NALKINWYKKG

25

icDengueIII UNC 3001

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 745 431 T3

	agttgttagt	ctacgtggac	cgacaagaac	agtttcgact	cggaagcttg	cttaacgtag	60
	tgctaacagt	tttttattag	agagcagatc	tctgatgaac	aaccaacgga	agaagacggg	120
	aaaaccgtct	atcaatatgc	tgaaacgcgt	gagaaaccgt	gtgtcaactg	gaccacagtt	180
	ggcgaagaga	ttctcaaaaag	gactgctgaa	cggccagggg	ccaatgaaat	tggttatggc	240
5	gttcatagct	ttcctcagat	ttctagccat	tccaccaaca	gcaggagtct	tggctagatg	300
	gggaaccttc	aagaagtccg	gagccattaa	ggtcctgaaa	ggcttcaaga	aggagatctc	360
	aaacatgctg	agcataatca	acaaacggaa	aaagacatcg	ctctgtctca	tgatgatatt	420
	gccagcagca	cttgctttcc	acttgacttc	acgagatgga	gagccgcgca	tgattgtggg	480
10	gaagaatgaa	agaggaaaat	ccctactttt	taagacagcc	tctggaatta	acatgtgcac	540
	actcatagcc	atggacttgg	gagagatgtg	tgatgacacg	gtcacttaca	aatgccccca	600
	cattaccgaa	gtggaacctg	aagacattga	ctgctgggtg	aaccttaca	caacatgggt	660
	gacttatgga	acgtgcaatc	aagctggaga	gcatagacgc	gacaaaagat	cagtggcggt	720
	agctcctcat	gtcggcatgg	gactggacac	acgcacccaa	acctggatgt	cggtgaagg	780
15	agcttgagga	caagtccgga	aggtagagac	atgggcccct	aggcaccag	ggttcaccat	840
	actagcccta	tttctgccc	attacatagg	cacttccctg	accagaagg	tggttatttt	900
	tatactacta	atgctggtca	ccccatccat	gacaatgaga	tgtgtgggaa	taggaaacag	960
	agattttgtg	gaaggtctat	caggagctac	gtgggttgac	gtggtgctcg	agcacggggg	1020
	gtgtgtgact	accatggcta	agaacaagcc	cacgctggat	atagagcttc	agaagaccga	1080
20	ggccacccaa	ctggcgacc	taaggaagct	atgcattgag	gggaaaatta	ccaacataac	1140
	aaactgactca	agatgtccta	cccaagggga	agcggttttg	ctgagggagc	aggaccagaa	1200
	ctacgtgtgt	aagcatacat	acgtagacag	aggctggggg	aacggttgtg	gcttgtttgg	1260
	caaggggaagc	ttggtaacgt	gtgcgaaatt	tcaatgcctg	gaaccaatag	agggaaaagt	1320
25	ggtgcaatat	gagaacctca	aatacacctg	catcattaca	gtgcacacag	gagaccaaca	1380
	ccaggtagga	aatgaaacgc	agggagtcac	ggctgagata	acacctcagg	catcaaccac	1440
	tgaagccatc	ttgcctgaat	atggaaccct	tgggctagaa	tgctcaccac	ggacagggtt	1500
	ggatttcaat	gaaatgatct	tactaacaat	gaagaacaaa	gcatggatgg	tacatagaca	1560
	atggtttttt	gacctacctc	taccatggac	atcaggagct	acaacagaaa	cgccaacctg	1620
30	gaacaggaag	gagcttcttg	tgacattcaa	aaacgcacat	gcaaaaaaac	agaagtagt	1680
	cgtccttggg	tgcgaagagg	gagcaatgca	taccgcaactg	acaggagcca	cagaaatcca	1740
	aaactcagga	ggcacaagca	tttttgctgg	gcacttaaaa	tgtagactta	agatggacaa	1800
	atttggaactc	aaggggatga	gctatgcaat	gtgcacgaat	acctttgtgt	tgaagaaaga	1860
	agctcagaa	acgcagcatg	ggacaatact	cattaaggct	gagtaacaag	gggaagatgc	1920
35	gccttgcaag	atccctttct	ccacagagga	tggacaaggg	aaagctcaca	atggcagact	1980
	gatcacagcc	aacctcagtg	tgactaagaa	ggaggagcct	gtcaatattg	aggctgaacc	2040
	tccttttggg	gaaagtaata	tagtaattgg	aattggagac	aacgccttga	aatcaactg	2100
	gtacaagaag	ggaagctcta	ttgggaagat	gttcgaggcc	actgccagag	gtgcaaggcg	2160
	catggccatc	ttgggagaca	cagcttggga	ctttggatca	gtgggtgggtg	ttctgaactc	2220
40	attaggcaaa	atggtgcacc	aaatattcgg	aagtgcctac	acagccctat	tcagtggagt	2280
	ctcttgggtg	atgaaaattg	gaataggtgt	tctcttgact	tggatagggt	tgaattcaaa	2340
	aaacacatcc	atgtcatttt	catgcattgc	gataggaatc	attacactct	atctgggagc	2400
	tgtggtacaa	gctgacatgg	ggtgtgtcat	aaactggaaa	ggcaaagaac	tcaaatgtgg	2460
45	aagtggaatt	ttcgtcacca	acgaggtcca	tacctggaca	gagcaataca	aattccaagc	2520
	agactcccca	aaaagattgg	cgacagccat	tgcaggcgct	tgggagaatg	gagtgtgctg	2580
	aattaggtca	acaaccagaa	tggagaatct	cctgtggaag	caaatagcca	atgaactgaa	2640
	ctacatatta	tgggaaaaca	atatcaaatt	aacggtagtt	gtgggcgata	caattggggg	2700
	cttagagcaa	ggaaaaagaa	cactaacacc	acaacctatg	gagctaaaaat	actcatggaa	2760
50	aacatgggga	aaggcaaaaa	tagtgacagc	tgaaacacaa	aattcctcct	tcataataga	2820
	cgggccaaac	acaccggagt	gtccaagtgc	ctcaagagca	tggaatgtgt	gggaggtgga	2880
	agattacggg	ttcggagtct	tcacaaccaa	catatggctg	aaactccgag	atgtgtacac	2940
	ccaactatgt	gaccataggc	taatgtcggc	agccgtcaag	gatgagaggg	ccgtacacgc	3000
	cgacatgggc	tattggatag	aaagccaaaa	gaatgggaag	tgggaagctag	aaaaagcatc	3060
55	cctcatagag	gtgaaaacct	gcacatggcc	aaaatcacac	actcttttga	gcaatggtgt	3120
	gctagagagt	gacatgatca	tcccaaagag	cctcgctggc	cctattttgc	aacacaacta	3180
	caggcctggg	taccacacc	aaacagcagg	accctggcac	ttaggaaaaat	tggagctgga	3240
	cttcaactat	tgtgaaggaa	caacagttgt	catcacagaa	aactgtggga	caagagccc	3300
	atcatgtaga	acaacaacag	tgtcagggaa	gttgatacac	gaatggtgtt	gccgctcgtg	3360
60	cacacttctc	cccctgcgat	acatgggaga	agacggctgc	tggtatggca	tggaaatcag	3420
	accatcagt	gagaagaag	agaacatggt	aaagtcttta	gtctcagcgg	gaagtggaaa	3480
	ggtggacaac	ttcacaatgg	gtgtcttgtg	tttggcaatc	ctctttgaag	aggatgatgag	3540

65

ES 2 745 431 T3

	aggaaaattt	gggaagaaac	acatgattgc	aggggttctc	ttcacgtttg	tgctccttct	3600
	ctcagggcaa	ataacatgga	gagacatggc	gcacacacta	ataatgattg	ggtccaacgc	3660
	ctctgacagg	atgggaatgg	gcgtcaccta	cctagcttta	attgcaacat	ttaaaatcca	3720
5	gccattcttg	gctttgggat	ttttcctaag	aaaactgaca	tctagagaaa	atlttattggt	3780
	aggagttggg	ctggctatgg	caacaacggt	acaactgcca	gaggacattg	aaacaaatggc	3840
	aaatggaatc	gctctggggc	tcatggctct	taaactgata	acacaatttg	aaacatacca	3900
	attatggacg	gcattagtct	ccttaacgtg	ttcaaatata	attccttacgt	tgactgtttgc	3960
	ctggagaaca	gccaccctga	ttttggccgg	agtttcgctt	ttaccagtgt	gccagtcttc	4020
10	gagcatgagg	aaaacagact	ggcttccaat	gacagtggca	gctatgggag	ttccaccctt	4080
	accacttttt	atlttttagct	tgaaagacac	actcaaaagg	agaagctggc	cactgaatga	4140
	aggggtgatg	gctgttgggc	ttgtgagcat	tctggccagt	tctctcctta	gaaatgatgt	4200
	gcccatggct	ggaccattag	tggccggggg	cttgctgata	gcgtgctacg	tcataactgg	4260
	cacctcagca	gacctcagca	tggaaaaaagc	agcagatgta	acatgggagg	aagagggtgc	4320
15	gcaaacagga	gtgtcccaca	acttaatgat	cacagttagt	gatgatggaa	caatgagaat	4380
	aaaagatgat	gagactgaga	acatcctaac	agtgtcttta	aaaacagcat	tactaatagt	4440
	atcaggcatc	tttccatact	ccatacccgc	aacattgttg	gtctggcata	cttggcagaa	4500
	gcaaaccocaa	aggtccggcg	ttctgtggga	cgtaccagc	ccccagaga	cacagaaagc	4560
	agaactggaa	gaaggggttt	ataggatcaa	acagcaagga	attccttggga	aaacccaagt	4620
20	aggggttggg	gtacagaaaag	aaggagtctt	ccacaccatg	tggcacgtca	caagaggggc	4680
	agtgttgaca	cataatggga	aaagactgga	accaaactgg	gctagcgtga	aaaaagatct	4740
	gatttcatac	ggaggaggat	ggagattgag	cgcgcaatgg	caaaaggggg	aggaggtgca	4800
	ggttattgcc	gtggagcctg	ggaagaacct	aaagaaactt	caaaccatgc	caggcacttt	4860
	tcagactaca	acaggggaaa	taggagcaat	tgcactggat	ttcaagcctg	gaacttcagg	4920
25	atctcctatc	ataaacagag	agggaaaggt	agtgggactg	tatggcaatg	gagtggttac	4980
	aaagaatggt	ggctacgtca	gcggaatagc	gcaaacaaat	gcagaaccag	atggaccgac	5040
	accagagttg	gaagaagaga	tgttcaaaaa	gcgaaatcta	accataatgg	atcttcatcc	5100
	tgggtcagga	aagacacgga	aataccttcc	agctattggt	agagaggcaa	tcaagagacg	5160
	tttaagaact	ctaattttgg	caccgacaag	ggtggttgca	gctgagatgg	aagaagcatt	5220
30	gaaagggctc	ccaataaggt	accaaacaac	agcaacaaaa	tctgaacaca	caggaagaga	5280
	gattgttgat	ctaattgtgcc	acgcaacggt	cacaatgctc	ttgctgtcac	cagttagggg	5340
	tccaaattat	aacttgataa	taatggatga	ggccatttcc	acagaccag	ccagcatagc	5400
	ggctagaggg	tacatatcaa	ctcgtgttgg	aatgggagag	gcagccgcaa	ttttcatgac	5460
	agcaacgccc	cctggaacag	ctgatgcctt	tctcagagc	aacgctccaa	ttcaagatga	5520
35	agaaagggac	ataccagaac	gctcatggaa	ttcaggcaat	gaatggatta	ccgacttctc	5580
	tgggaaaaac	gtgtggtttg	tccccagcat	taaaggcga	aatgacatag	caaactgctt	5640
	gcggaaaaac	ggaaaaaagg	tcaattcaact	tagtaggaag	acttttgaca	cagaatatca	5700
	gaagactaaa	ctgaatgatt	gggacttctg	ggtgacaact	gacatttcag	aaatgggggg	5760
	caatttcaaa	gcagatagag	tgatcgaccc	aagaagatgt	ctcaaaccag	tgatcctgac	5820
40	agatggacca	gagcgggtga	tctctggctgg	accaatgcca	gtcaccgctg	cgagtgtctc	5880
	gcaaaggaga	ggaagagttg	gcaggaacct	acaaaaagaa	aatgaccagt	acataattcac	5940
	gggccagcct	ctcaacaatg	atgaagacca	tgtcactggt	acagaagcaa	aaatgctgct	6000
	ggacaacatt	aacacaccag	aagggattat	accagctctc	tttgaaccag	aaagggagaa	6060
	gtcagccgcc	atagacggtg	agtatcgctt	gaaggtgtag	tccaggaaga	ctttcgtgga	6120
45	actcatgagg	aggggtgacc	ttccagtttg	gtagcccat	aaagtagcat	cagaagggat	6180
	caaataataca	gatagaaaat	ggtgctttga	tggacaacgc	aataatcaaa	ttttagagga	6240
	gaacatggat	gtggaaatct	ggacaaagga	aggagaaaag	aaaaaattga	gacctaggtg	6300
	gcttgatgcc	cgcacttatt	cagatccctt	agcactcaag	gaatttaagg	actttgcggc	6360
	tggcagaaaag	tcaatcgccc	ttgatcttgt	gacagaaaata	ggaagagtgc	cttcacacct	6420
50	agcccacaga	acgagaaaac	ctctggacaa	tctggtgatg	ctgcatacgt	cagaacatgg	6480
	cggtagggcc	tacaggcatg	cggtggagga	actaccagaa	acaatggaaa	cacttttact	6540
	cttgggactc	atgatcttgt	tgacaggtgg	agcaatgctt	ttcttgatat	caggaaaagg	6600
	gattggaaaag	aottcaatag	gactcatttg	tgtaattgcc	tccagcggca	tgttgtggat	6660
	ggccgaaatc	ccactccagt	ggatcgctgc	ggctatagtc	ctggagtttt	ttatgatggg	6720
55	gttgcttata	ccagaaccag	aaaagcagag	aaccccccaa	gacaaccaac	tcgcatatgt	6780
	cgtgataggc	atacttacat	tggctgcaat	aatagcagcc	aatgaaatgg	gactgttggg	6840
	aactacaaaag	agagatttag	gaatgtctaa	ggagccaggt	ggtgtttctc	caaccagcta	6900
	tttgatgtg	gactttgcacc	cagcatcagc	ctggacattg	tacgccgtgg	ccactacagt	6960
	aataacacca	atggttaagac	ataccataga	gaattctaca	gcaaatgtgt	ccctggcagc	7020
60	tatagccaac	caggcagttg	tctctgatgg	tttggacaaa	ggatggccaa	tatcaaaaaat	7080
	ggacttaggc	gtaccactac	tggcattggg	ttgctattca	caagtgaacc	cactgactct	7140
	aacagcggca	gtacttttgc	taatcacaca	ttatgctatt	ataggtccag	gattgcaggc	7200

65

ES 2 745 431 T3

	aaaagccact	cgtgaagctc	agaaaaggac	agctgctgga	ataatgaaga	atccaacggt	7260
	ggatgggata	atgacaatag	acctagatcc	tgtaatatat	gattcaaaat	ttgaaaagca	7320
	actgggacag	gttatgctcc	tggttttgtg	tgcagttcaa	cttttgtaa	tgagaacatc	7380
5	atgggccttg	tgtgaagctt	taactctagc	tacaggacca	ataacaacac	tctgggaagg	7440
	atcacctgga	aagttttgga	acaccacgat	agctgtttcc	atggcgaaca	tttttagagg	7500
	gagctattta	gcaggagctg	ggcttgcttt	ttctattatg	aatcagttg	gaacaggaaa	7560
	aagaggaaca	ggttcacaag	gcgaaacttt	aggagaaaaa	tggaaaaaga	aattaaatca	7620
10	attatcccgg	aaagagtttg	acctttacaa	gaaatctgga	atcactgaag	tggatagaac	7680
	agaagccaaa	gaagggttga	aaagaggaga	aataacacat	catgccgtgt	ccagaggtag	7740
	cgcaaaactt	caatggtttg	tggagagaaa	catggtcatt	cccgaaggaa	gagtcataga	7800
	cttgggctgt	ggaagaggag	gctggtcata	ctactgtgca	ggactgaaaa	aagtacacaga	7860
	agtgcgagga	tacacaaaag	gcggtccagg	acacgaagaa	ccagtaccta	tgtctacata	7920
15	tggatggaac	atagttaagt	taatgagtg	aaaggatgtg	ttttatcttc	cacctgaaaa	7980
	gtgtgatacc	ctgtttgtgtg	acatcggaga	atcttcacca	agcccaacag	tggaagaaag	8040
	cagaactata	agagttttga	agatggttga	accatggcta	aaaaacaacc	agttttgcat	8100
	taaagtattg	aacccttaca	tgccaactgt	gattgagc	ctagaaagac	tacaaaggaa	8160
	acatggagga	atgcttgtga	gaaatccact	ttcacgaaac	tccacgcacg	aaatgtactg	8220
20	gatattcta	ggcacaggta	acattgtctc	ttcagtc	atggtatcta	gattgctact	8280
	gaacaggttc	acgatgacac	acaggagacc	taccatagag	aaagatgtgg	atlttaggagc	8340
	aggaactcga	catgttaatg	cggaaccaga	aacacccaac	atggatgtca	ttggggaaag	8400
	aataaaaagg	atcaaggagg	agcacaattc	aacatggcac	tatgatgacg	aaaaccctta	8460
	caaaacgtgg	gcttaccacg	gatcctatga	agtcaaagcc	acaggtcag	cctcctccat	8520
25	gataaatgga	gtcgtgaaac	tcctcactaa	accatgggat	gtggtgcca	tggtgacaca	8580
	gatggcaatg	acagatacaa	ctccatttgg	ccagcagaga	gtctttaaag	agaaagtgga	8640
	caccaggaca	cccaggccca	tgccagggac	aagaaaggtt	atggggatca	cagcggatg	8700
	gctctggaga	accctgggaa	ggaacaaaag	accaggtta	tgcacaaggg	aagagtttac	8760
	aaaaaaaggtc	agaactaacg	agccatggg	cgccgttttc	acagaggaga	accaatggga	8820
30	cagtgcgaaa	gctgctgttg	aggatgaaga	atltttgaaa	cttgtggaca	gagaacgtga	8880
	actccacaaa	ttgggcaagt	gtggaagctg	tgtttacaac	atgatgggca	agagagagaa	8940
	gaaacttgg	gagtttggca	aagcaaaagg	cagtagagct	atatggtaca	tgtggttggg	9000
	agccaaggtac	cttgagttcg	aagcccttgg	attcctaaat	gaagaccact	ggttctcgcg	9060
35	tgacaactct	tacagtggag	tagaaggaga	aggactgcac	aagctaggct	acatattaag	9120
	ggacatttcc	aagatacccc	gaggagctat	gtatgctgat	gacacagctg	gttgggacac	9180
	aagaataaca	gaagatgacc	tgcacaatga	ggaaaagatc	acacagcaa	tggaccctga	9240
	acacaggcag	ttagcgaacg	ctatatttaa	gtcacatac	caaaacaaag	tggtaaagt	9300
	tcaacgaccg	actccaacgg	gcacggtaat	ggacatcata	tctaggaaaag	accaaaagagg	9360
40	cagtggacag	gtgggaactt	atggtctgaa	tacattcacc	aacatggaag	tccagttagt	9420
	cagacaaatg	gaaggagaag	gtgtgctgtc	aaaggcagac	ctcgagaacc	ctcatctgcc	9480
	agagaagaaa	attacacaat	ggttggaaac	caaaggagtg	gagaggttaa	aaagaatggc	9540
	cattagcggg	gatgattgtg	tagtgaacc	aatcgatgac	aggttcgcta	atgccctgct	9600
	tgctctgaac	gatatgggaa	aggttcggaa	agacatacct	caatggcagc	catcaaaggg	9660
45	atggcatgat	tggcaacagg	ttcctttctg	ctcccaccac	tttcatgaat	tgatcatgaa	9720
	agatggaaga	aagtttagtg	ttccctgtag	accccaggac	gaactaatag	gaagagcaag	9780
	aatctctcaa	ggagcgggat	ggagccttag	agagaccgca	tgtctgggga	aagcctacgc	9840
	tcaaatgtgg	agtctcatgt	actttcacag	aagagatctc	agactagcat	ccaacgccat	9900
	atgttcagca	gtaccagtc	actgggtccc	cacaagtaga	acgacatggt	ctattcatgc	9960
50	tcaccatcag	tggatgacta	cagaagacat	gcttactgtc	tggaacaggg	tgtggatcga	10020
	ggacaatcca	tggatggaag	acaaaactcc	agttacaacc	tgggaaaatg	ttccatatct	10080
	agggaaagaga	gaagaccaat	ggtgcggatc	acttattggt	ctcaccctca	gagcaacctg	10140
	ggcccagaac	atacccacag	caattcaaca	ggtgagaagt	cttataggga	atgaagagtt	10200
	tctggattac	atgccttcaa	tgaagagatt	caggaaggag	gaggagtcgg	aaggagccat	10260
55	ttggtaaaacg	taggaagtga	aaaagaggca	aactgtcagg	ccacctaag	ccacagtacg	10320
	gaagaagctg	tgtgcctgt	gagccccgtc	caaggacggt	aaaagaagaa	gtcaggcccc	10380
	aaagccacgg	tttgagcaaa	ccgtgctgcc	tgtagctccg	tctgtggggac	gtaaaacctg	10440
	ggaggctgca	aactgtggaa	gctgtacgca	cggtgtagca	gactagcggg	tagaggagac	10500
	ccctcccatg	acacaacgca	gcagcggggc	ccgagcactg	agggaaagctg	tacctccttg	10560
60	caaaggacta	gaggttagag	gagaccccc	gcaaacaaaa	acagcatatt	gacgctggga	10620
	gagaccagag	atcctgctgt	ctcctcagca	tcattccagg	cacagaacgc	cagaaaatgg	10680
	aatgggtgctg	ttgaatcaac	aggttcttaa	aagagacg			10718

65

ES 2 745 431 T3

icDenguel WestPac74

	agttgtagt	ctacgtggac	cgacaagaac	agtttcgaat	cggaagcttg	cttaacgtag	60
	ttctaacagt	tttttattag	agagcagatc	tctgatgaac	aaccaacgga	aaaagacggg	120
5	tgcaccgtct	ttcaatatgc	tgaaacgcgc	gagaaaccgc	gtgtcaactg	tttcacagtt	180
	ggcgaagaga	ttctcaaaag	gattgctttc	aggccaagga	cccatgaaat	tggatgtagc	240
	ttttatagca	ttcctaagat	ttctagccat	acctccaaca	gcaggaattt	tggctagatg	300
	gggctcattc	aagaagaatg	gagcgatcaa	agtgttacgg	ggtttcaaga	aagaaatctc	360
	aaacatgttg	aacataatga	acaggaggaa	aagatctgtg	accatgctcc	tcatgctgct	420
10	gccccacagcc	ctggcggttc	atctgaccac	ccgaggggga	gagccgcaca	tgatagttag	480
	caagcaggaa	agaggaaaat	cacttttggt	taagacctct	gcaggtgtca	acatgtgcac	540
	ccttattgca	atggatttgg	gagagttatg	tgaggacaca	atgacctaca	aatgcccccg	600
	gatcactgag	acggaaccag	atgacgttga	ctggttggtc	aatgccacgg	agacatgggt	660
	gacctatgga	acatgttctc	aaactgggtga	acaccgacga	gacaaacggt	ccgtcgcact	720
15	ggcaccacac	gtagggcttg	gtctagaaac	aagaaccgaa	acgtggatgt	cctctgaagg	780
	cgcttgga	caaatacaaa	aagtggagac	ctgggctctg	agacaccag	gattcacggt	840
	gatagccctt	tttctagcac	atgccatagg	aacatccatc	accagaaaag	ggatcatttt	900
	tattttgctg	atgctggtaa	ctccatccat	ggccatgctg	tgctgaggaa	taggcaacag	960
20	agacttcgtg	gaaggactgt	caggagctac	gtgggtggat	gtggtactgg	agcatggaag	1020
	ttgctgact	accatggcaa	aagacaaacc	aacactggac	attgaactct	tgaagacgga	1080
	ggtcaca	cctgcccgtc	tgcgcaaact	gtgcattgaa	gctaaaatat	caaacaccac	1140
	caccgattcg	agatgtccaa	cacaaggaga	agccacgctg	gtggaagaac	aggacacgaa	1200
	cittgtgtgt	cgacgaacgt	tcgtggacag	aggctggggc	aatggttgtg	ggctattcgg	1260
25	aaaaggtagc	ttaataacgt	gtgctaagtt	taagtgtgtg	acaaaactgg	aaggaaagat	1320
	agtccaatat	gaaaacttaa	aatattcagt	gatagtcacc	gtacacactg	gagaccagca	1380
	ccaagttgga	aataagacca	cagaacatgg	aacaattgca	accataacac	ctcaagctcc	1440
	cacgtcggaa	atacagctga	cagactacgg	agctctaaca	ttggattggt	cacctagaac	1500
	agggctagac	tttaatgaga	tggtgttggt	gacaatgaaa	aaaaaatcat	ggctcgtcca	1560
30	caaacaatgg	tttctagact	taccactgcc	ttggacctcg	ggggcttcaa	catccaaga	1620
	gacttggaat	agacaagact	tgctggctac	atttaagaca	gctcatgcaa	aaaagcagga	1680
	agtagtcgta	ctaggatcac	aagaaggagc	aatgcacact	gctgtgactg	gagcgacaga	1740
	aatccaaacg	tctggaacga	caacaatfff	tgcaggacac	ctgaaatgca	gactaaaaat	1800
	ggataaacctg	actttaaaag	ggatgtcata	tgtaatgtgc	acagggtcat	tcaagttaga	1860
35	gaaggaagtg	gctgagacc	agcatggaac	tgttctagt	caggttaaat	acgaagaaac	1920
	agatgcacca	tgcaagatcc	ccttctcgtc	ccaagatgag	aagggagtaa	cccagaatgg	1980
	gagattgata	acagccaacc	ccatagtcac	tgacaaagaa	aaaccagtca	acattgaagc	2040
	ggagccacct	tttggtgaga	gctacattgt	ggtaggagca	ggtgaaaaag	ctttgaaact	2100
	aagctggttc	aagaagggaa	gcagtatagg	gaaaatgttt	gaagcaactg	cccgtggagc	2160
40	acgaaggatg	gccatcctgg	gagacactgc	atgggacttc	ggttctatag	gaggggtggt	2220
	cacgtctgtg	ggaaaactga	tacaccagat	ttttgggact	gcgtatggag	ttttgttcag	2280
	cggtgtttct	tggaccatga	agataggaat	agggattctg	ctgacatggc	taggattaaa	2340
	ctcaagtgagc	acgtcccttt	caatgacgtg	tatcgcagtt	ggcatggtca	cgctgtacct	2400
	aggagctcatg	gttcaggcgg	actcgggatg	tgtaatcaac	tggaaaggca	gagaactcaa	2460
45	atgtggaagc	ggcatttttg	tcaccaatga	agtccacacc	tggacagagc	aatataaatt	2520
	ccaggccgac	tcccctaaga	gactatcagc	ggccattggg	aaggcatggg	aggagggtgt	2580
	gtgtggaatt	cgatcagcca	ctcgtctcga	gaacatcatg	tggaaagcaa	tatcaaatga	2640
	attaaccac	atcttacttg	aaaatgacat	gaaatttaca	gtggctcgtg	gagacgttag	2700
	tggaatcttg	gccaaggaa	agaaaatgat	taggccacaa	cccatggaac	acaataactc	2760
50	gtggaaaagc	tggggaaaag	ccaaaatcat	aggagcagat	gtacagaata	ccaccttcat	2820
	catcgacggc	ccaaacaccc	cagaatgccc	tgataaccaa	agagcatgga	acatttggga	2880
	agttgaagac	tatggatttg	gaatfttcac	gacaaacata	tggttgaaat	tgcgtgactc	2940
	ctacactcaa	gtgtgtgacc	accggctaat	gtcagctgcc	atcaaggata	gcaaagcagt	3000
	ccatgctgac	atggggattt	ggatagaaaag	tgaaaagaac	gagacttggg	agttggcaag	3060
55	agcctccttc	atagaagtta	agacatgcat	ctggccaaaa	tcccacactc	tatggagcaa	3120
	tggagtctctg	gaaagtgaga	tgataatccc	aaagatatat	ggaggaccaa	tatctcagca	3180
	caactacaga	ccaggatatt	tcacacaaac	agcagggccg	tggcacttgg	gcaagttaga	3240
	actagatfff	gatttatgtg	aaggatccac	tgttgtgtgtg	gatgaacatt	gtggaaatcg	3300
60	aggaccatct	cttagaacca	caacagtcac	aggaaagaca	atccatgaat	ggtgctgtag	3360
	atcttgcacg	ttaccccccc	tacgtttcaa	aggagaagac	gggtgctggt	acggcatgga	3420
	aatcagacca	gtcaaggaga	aggaagagaa	cctagttaag	tcaatggtct	ctgcagggtc	3480
	aggagaagtg	gacagttttt	cactaggact	gctatgcata	tcaataatga	tcgaagaggt	3540

65

ES 2 745 431 T3

	aatgagatcc	agatggagca	gaaaaatgct	gatgactgga	acattggctg	tgttcctcct	3600
	tcttacaatg	ggacaattga	catggaatga	tctgatcagg	ctatgtatca	tggttggagc	3660
	caacgcttca	gacaagatg	ggatgggaaac	aacgtaccta	gctttgatgg	ccactttcag	3720
5	aatgagacca	atgttcgcag	tcgggctact	gtttcgcaga	ttaacatcta	gagaagttct	3780
	tcttcttaca	gttggattga	gtctggtggc	atctgtagaa	ctaccaaatt	ccttagagga	3840
	gctaggggat	ggacttggca	tgggcatcat	gatgttgaaa	ttactgactg	attttcagtc	3900
	acatcagcta	tgggctacct	tgctgtcttt	aacatttgtc	aaaacaactt	tttcattgca	3960
	ctatgcatgg	aagacaatgg	ctatgatact	gtcaattgta	tctctcttcc	ctttatgcct	4020
10	gtccacgact	tctcaaaaaa	caacatggct	tccgggtgtg	ctgggatctc	ttggatgcaa	4080
	accactaacc	atgtttctta	taacagaaaa	caaaatctgg	ggaaggaaaa	gctggcctct	4140
	caatgaagga	attatggctg	ttggaatagt	tagcattctt	ctaagttcac	ttctcaagaa	4200
	tgatgtgcca	ctagctggcc	cactaatagc	tgagggatg	ctaatagcac	gttatgtcat	4260
	atctggaagc	tcggccgatt	tatcactgga	gaaagcggct	gaggtctcct	gggaagaaga	4320
15	agcagaacac	tctggtgcct	cacacaacat	actagtggag	gtccaagatg	atggaacat	4380
	gaagataaag	gatgaagaga	gagatgacac	actcaccatt	ctcctcaaag	caactctgct	4440
	agcaatctca	ggggatatac	caatgtcaat	accggcgacc	ctctttgtgt	ggtatttttg	4500
	gcagaaaaag	aaacagagat	caggagtgtc	atgggacaca	cccagccctc	cagaagtgga	4560
	aagagcagtc	cttgatgatg	gcattttatag	aatttctcaa	agaggattgt	tgggcaggtc	4620
20	tcaagtagga	gtaggagitt	ttcaagaagg	cgtgtttccac	acaatgtggc	acgtcaccag	4680
	gggagctgtc	ctcatgtacc	aagggaagag	actggaacca	agttgggcca	gtgtcaaaaa	4740
	agacttgatc	tcatatggag	gaggttggag	gtttcaagga	tccctggaacg	cgggagaaga	4800
	agtgcaggtg	attgctgttg	aaccggggaa	gaaccccaaa	aatgtacaga	cagcgccggg	4860
	taccttcaag	acccctgaag	gcgaagltgg	agccatagct	ctagacttta	aaccggcac	4920
25	atctggatct	cctatcgtga	acagagaggg	aaaaatagta	ggtctttatg	gaaatggagt	4980
	ggtgacaaca	agtggtacct	acgtcagtg	catagctcaa	gctaaagcat	cacaagaagg	5040
	gcctctacca	gagattgag	acgaggtgtt	taggaaaaga	aacttaacaa	taatggacct	5100
	acatccagga	tcgggaaaaa	caagaagata	ccttccagcc	atagtcctgt	aggccataaa	5160
	aagaaagctg	cgcacgctag	tcttagctcc	cacaagagtt	gtcgttctg	aaatggcaga	5220
30	ggcgctcaag	ggaatgccaa	taaggtatca	gacaacagca	gtgaagagt	aacacacggg	5280
	aaaggagata	gttgacctta	tgtgtcacgc	cactttcact	atgctgtctc	tgtctcctgt	5340
	gagagttccc	aattataata	tgattatcat	ggatgaagca	catttcaccg	atccagccag	5400
	catagcagcc	agagggata	tctcaacccg	agtgggtatg	ggtgaagcag	ctgcgathtt	5460
	catgacagcc	actccccccg	gatcgggtgga	ggcctttcca	cagagcaatg	cagttatcca	5520
35	agatgaggaa	agagacattc	ctgaaagatc	atggaactca	ggctatgact	ggatcactga	5580
	tttcccaggt	aaaacagtct	ggtttgttcc	aagcatcaaa	tcaggaaatg	acattgcaa	5640
	ctgtttaaga	aagaatggga	aacgggtgtg	ccaattgagc	agaaaaactt	ttgacactga	5700
	gtaccagaaa	acaaaaata	acgactggga	ctatgttgtc	acaacagaca	tatccgaaat	5760
	gggagcaaac	ttccgagccg	acagggtaat	agacccgagg	cggtgcctga	aaccggtaat	5820
40	actaaaagat	ggcccagagc	gtgtcattct	agccggaccg	atgccagtga	ctgtggctag	5880
	cgccgcccag	aggagaggaa	gaattggaag	gaacccaaat	aagggaaggc	atcagtatat	5940
	ttacatggga	cagcctctaa	acaatgatga	ggaccacgcc	cattggacag	aagcaaaaat	6000
	gctccttgac	aacataaaca	caccagaagg	gattatccca	gccctctttg	agccggagag	6060
	agaaaaaggt	gcagcaatag	acggggaata	cagactacgg	ggtgaagcga	ggaaaacggt	6120
45	cgtggagctc	atgagaagag	gagatttacc	tgtctggcta	tctacaaaag	ttgcctcaga	6180
	aggcttccag	tactccgaca	gaaggtgggt	ctttgatggg	gaaaggaaca	accaggtggt	6240
	ggaggagAAC	atggacgtgg	agatctggac	aaaagaagga	gaaagaaaga	aactacgacc	6300
	ccgctggctg	gatgccagaa	catactctga	cccactggct	ctgcgcgaat	tcaaagagtt	6360
	cgcagcagga	agaagaagcg	tctcaggtga	cctaataatta	gaaataggga	aacttccaca	6420
50	acatttaacg	caaagggcc	agaacgcctt	ggacaatctg	gttatgttgc	acaactctga	6480
	acaaggagga	aaagcctata	gacacgccat	ggaagaacta	ccagacacca	tagagacggt	6540
	aatgctccta	gctttgatag	ctgtgctgac	tggtggagt	acgttgttct	tctatcagg	6600
	aaggggtcta	ggaaaaacat	ccattggcct	actctgctg	attgcctcaa	gtgactggt	6660
	atggatggcc	agtgtggaac	cccattggat	agcggcctct	atcatactgg	agttctttct	6720
	gatggtgttg	cttattccag	agccggacag	acagcgcact	ccacaagaca	accagctagc	6780
55	atacgtggtg	ataggtctgt	tattctgatg	attgacagt	gcagccaatg	agatgggatt	6840
	actggaacc	acaaagaagg	acctgggat	tggtcatgca	gctgctgaaa	accacatca	6900
	tgctgcaatg	ctggacgtag	acctacatcc	agcttcagcc	tggtactctc	atgcagtggc	6960
	cacaacaatt	atcactccca	tgatgagaca	cacaattgaa	aacacaacgg	cgaatatttc	7020
	cctgacagct	attgcaaacc	agggcagctat	attgatggga	cttgacaagg	gatggccaat	7080
60	atcaaagatg	gacataggag	ttccacttct	cgccttgggg	tgctattctc	aggtgaaccc	7140
	gctgacgctg	acagcggcgg	tattttatgct	agtggtctcat	tatgccataa	ttggaccggg	7200

65

ES 2 745 431 T3

	actgcaagca	aaagctacta	gagaagctca	aaaaaggaca	gcagccggaa	taatgaaaaa	7260
	cccaactgtc	gacgggatcg	ttgcaataga	tttgaccct	gtgggtttacg	atgcaaaatt	7320
	tgaaaaacag	ctaggccaaa	taatgttggt	gatactttgc	acatcacaga	tcctcctgat	7380
5	gctggaccaca	tgggcttgt	gtgaatccat	cacactagcc	actggacctc	tgactacgct	7440
	ttgggaggga	tctccaggaa	aattctggaa	caccacgata	gcggtgtcca	tggcaaacat	7500
	ttttagggga	agttatctag	caggagcagg	tctggccttt	tcattaatga	aatctctagg	7560
	aggaggtagg	agaggcacgg	gagcccaagg	ggaaacactg	ggagaaaaat	ggaaaagaca	7620
	gctaacccaa	ttgagcaagt	cagaattcaa	cacttacaaa	aggagtggga	ttatagaggt	7680
10	ggatagatct	gaagccaaa	aggggttaaa	aagaggagaa	acgactaaac	acgcagtgtc	7740
	gagaggaacg	gccaaactga	gggtggtttgt	ggagaggaac	cttgtgaaac	cagaagggaa	7800
	agtcatagac	ctcggttgtg	gaagaggtgg	ctggatcat	tattgctgtg	ggctgaagaa	7860
	agtcacagaa	gtgaaaggat	acacgaaagg	aggacctgga	catgaggaac	caatcccaat	7920
	ggcaacctat	ggatggaacc	tagtaaagct	atactccggg	aaagatgtat	tctttacacc	7980
15	acctgagaaa	tgtgacaccc	tcttgtgtga	tattggtgag	tcctctccga	acccaactat	8040
	agaagaagga	agaacgttac	gtgttctaaa	gatggtggaa	ccatggctca	gaggaaacca	8100
	atthttgcata	aaaattctaa	atccctatat	gccgagtgtg	gtagaaactt	tggagcaaat	8160
	gcaaagaaaa	catggaggaa	tgctagtgcg	aaatccactc	tcaagaaact	ccactcatga	8220
	aatgtactgg	gtttcatgtg	gaacagggaa	cattgtgtca	gcagtaaca	tgacatctag	8280
20	aatgctgcta	aatcgattca	caatggctca	caggaagcca	acatatgaaa	gagacgtgga	8340
	cttaggcgct	ggaacaagac	atgtggcagt	agaaccagag	gtggccaacc	tagatatcat	8400
	tggccagagg	atagagaata	taaaaaatga	acacaaatca	acatggcatt	atgatgagga	8460
	caatccatac	aaaacatggg	cctatcatgg	atcatatgag	gtcaagccat	caggatcagc	8520
	ctcatccatg	gtcaatgggtg	tgggtgagact	gctaaccaaa	ccatgggatg	tcattcccat	8580
25	ggtcacacaa	atagccatga	ctgacaccac	accctttgga	caacagaggg	tgtttaaaga	8640
	gaaagttgac	acgcgtacac	caaaagcgaa	acgaggcaca	gcacaaatta	tggaggtgac	8700
	agccaggtgg	ttatgggggt	ttctctctag	aaacaaaaaa	cccagaatct	gcacaagaga	8760
	ggagtccaca	agaaaagtca	ggtcaaacgc	agctattgga	gcagtgttcg	tcgatgaaa	8820
	tcaatggaac	cttcataaac	aggcagtgga	agatgaacgg	ttctgggacc	ttgtgacag	8880
30	agagagggag	aaattaggag	aaggaaaatg	tgccacgtgt	gtctacaaca	tgatgggaaa	8940
	gagagagaaa	aaattaggag	agttcggaaa	ggcaaaagga	agtcgcgcaa	tatggtacat	9000
	gtggttggga	gcgcgctttt	tagagtttga	agcccttggg	ttcatgaatg	aagatcactg	9060
	gttcagcaga	gagaattcac	tcagtggagt	ggaaggagaa	ggactccaca	aacttggata	9120
	catactcaga	gacatatcaa	agattccagg	gggaaatatg	tatgcagatg	acacagccgg	9180
35	atgggacaca	agaataacag	aggatgatct	tcagaatgag	gccaaaatca	ctgacatcat	9240
	ggaacctgaa	catgccctat	tggccacgct	aatctttaag	ctaacctacc	aaaacaaggt	9300
	agtaaggggtg	cgagaccag	cgaaaaatgg	aaccgtgatg	gatgtcatat	ccagacgtga	9360
	ccagagagga	agtggacagg	ttggaaccta	tggcttaaac	accttcacca	acatggaggc	9420
	ccaactaata	agacaaatgg	agtctgaggg	aatcttttca	cccagcgaat	tggaaacccc	9480
40	aaatctagcc	gaaagagtcc	tcgactgggt	gaaaaaacat	ggcaccgaga	ggctgaaaag	9540
	aatggcaatc	agtggagatg	actgtgtggt	gaaaccaatt	gatgacagat	ttgcaacagc	9600
	cttaacagct	ttgaatgaca	tgggaaaggt	aagaaaagac	ataccgcaat	gggaaccttc	9660
	aaaaggatgg	aatgatggc	aacaagtgcc	ttctgtttca	caccatttcc	accagctgat	9720
45	tatgaaggat	gggagggaga	tagtgggtgcc	atgccgcaac	caagatgaac	ttgtaggtag	9780
	ggccagagta	tcacaaggcg	ccggatggag	cttgagagaa	actgcatgcc	taggcaagtc	9840
	atatgcacaa	atgtggcagc	tgatgtactt	ccacaggaga	gacttgagat	tagcggctaa	9900
	tgctatctgt	tcagccgttc	cagttgattg	ggtccaacc	agccgtacca	cctggctgat	9960
	ccatgcccac	catcaatgga	tgacaacaga	agacatgttg	tcagtgtgga	atagggtttg	10020
50	gatagaggaa	aacctatgga	tggaggacaa	gactcatgtg	tccagttggg	aagacgttcc	10080
	atacctagga	aaaagggaag	atcaatgggtg	tggatcccta	ataggcttaa	cagcacgagc	10140
	cacctgggcc	accaacatac	aagtggccat	aaaccaagtg	agaaggctca	ttgggaatga	10200
	gaattatcta	gacttcatga	catcaatgaa	gagattcaaa	aacgagagtg	atcccgaagg	10260
	ggcactctgg	taagccaact	cattcacaaa	ataaaggaaa	ataaaaaatc	aaacaaggca	10320
55	agaagtcagg	ccggattaag	ccatagcacg	gtaagagcta	tgctgcctgt	gagccccgtc	10380
	caaggacgta	aaatgaaatc	aggccgaaag	ccacggttcg	agcaagccgt	gctgcctgta	10440
	gctccatcgt	ggggatgtaa	aaaccgggga	ggctgcaaac	catggaagct	gtacgcatgg	10500
	ggtagcagac	tagtgggttag	aggagacccc	tccaagaca	caacgcagca	gctggggcca	10560
	acaccagggg	aagctgtacc	ctgggtggtaa	ggactagagg	ttagaggaga	ccccccgac	10620
60	aacaacaaac	agcatattga	cgctgggaga	gaccagagat	cctgctgtct	ctacagcatc	10680
	attccaggca	cagaacgcca	gaaaatggaa	tggtgctggt	gaatcaacag	gttctaaacg	10740
	aagagc						10746

65

REIVINDICACIONES

1. Una glicoproteína E del virus del dengue quimérico que comprende una cadena principal de la glicoproteína E del virus del dengue que comprende sustituciones de aminoácidos que introducen un epítipo reconocido por un anticuerpo que es reactivo con un serotipo del virus del dengue diferente del serotipo del virus del dengue de la cadena principal de la glicoproteína E; en donde la glicoproteína E del virus del dengue quimérico comprende la secuencia de aminoácidos:

MRCVIGIGNRDFVEGLSGATWVDVVLEHGSCVTTMAKDKPTLDIELLKTE**ATQLAT**LRKLC
IEAKISNTTTDSRCPTQGEATLVEEQDTNFVCRRTFVDRGWGNGCGLFGKGLITCAKFK
CVTK**IEGKVV**QYENLKYSVIVTVHTGDQHQVGNETTEHGT**IATITPQAPTSEIQLTDYGA**
LTLDCSPRTGLDFNEM**ILLTMKNKAWM**VHRQWFLDLPLPWTSGASTSQETWNRQDLLVTF
KTAHAKKQEVVVLGSQEGAMHTALTGATEIQ**NSGGS**IFAGHLKCRKMDKLTLLKGMSYV
MCTGSFKLEKEVAETQHGTVLVQVKYEGTDAPCKIPFSSQDEKGVTONGRLLITANPIVTD
KEKPVNIEAEPFPGESYIVVGAGEKALKLSWFKKG

o la secuencia de aminoácidos:

MRCVIGIGNRDFVEGLSGATWVDVVLEHGGCVTTMAKNKPTLDIEL**FKTEVTNP**AVLRKLCI
EGKITNITTTDSRCPTQGEAVLPEEQDQNYVCKHTYVDRGWGNGCGLFGKGLVITCAKFOCL
EPIEGKVVQYENLKYS**SVIV**TVHTGDQHQVGNET**TEHGTIATITPQAPTSEIQLTDY**ALGL
ECSPTGLDFNEMILLTMKNKAWMVHRQWFFDLPLPWTSGATTEPTWNRKELLVTFKNAH
AKKQEVVVLGSQEGAMHTALTGATEIQ**TSGTTT**IFAGHLKCRKMDKLELKGMSYAMCTNT
FVLKKEVSETQHGTILIKVEYKGEDAPCKIPFSTEDGQGAHNGRLITANPVVTKKEEPVN
IEAEPFPGESNIVIGIGDNALKINWYKKG.

2. La glicoproteína E del virus del dengue quimérico de la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos:

MRCVIGIGNRDFVEGLSGATWVDVVLEHGSCVTTMAKDKPTLDIELLKTE**ATQLAT**LRKLC
IEAKISNTTTDSRCPTQGEATLVEEQDTNFVCRRTFVDRGWGNGCGLFGKGLITCAKFK
CVTK**IEGKVV**QYENLKYSVIVTVHTGDQHQVGNETTEHGT**IATITPQAPTSEIQLTDYGA**
LTLDCSPRTGLDFNEM**ILLTMKNKAWM**VHRQWFLDLPLPWTSGASTSQETWNRQDLLVTF
KTAHAKKQEVVVLGSQEGAMHTALTGATEIQ**NSGGS**IFAGHLKCRKMDKLTLLKGMSYV
MCTGSFKLEKEVAETQHGTVLVQVKYEGTDAPCKIPFSSQDEKGVTONGRLLITANPIVTD
KEKPVNIEAEPFPGESYIVVGAGEKALKLSWFKKG

3. La glicoproteína E del virus del dengue quimérico de la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos:

MRCVIGIGNRDFVEGLSGATWVDVVLEHGGCVTTMAKNKPTLDIEL**FKTEVTNP**AVLRKLCI
EGKITNITTTDSRCPTQGEAVLPEEQDQNYVCKHTYVDRGWGNGCGLFGKGLVITCAKFOCL
EPIEGKVVQYENLKYS**SVIV**TVHTGDQHQVGNET**TEHGTIATITPQAPTSEIQLTDY**ALGL
ECSPTGLDFNEMILLTMKNKAWMVHRQWFFDLPLPWTSGATTEPTWNRKELLVTFKNAH
AKKQEVVVLGSQEGAMHTALTGATEIQ**TSGTTT**IFAGHLKCRKMDKLELKGMSYAMCTNT
FVLKKEVSETQHGTILIKVEYKGEDAPCKIPFSTEDGQGAHNGRLITANPVVTKKEEPVN
IEAEPFPGESNIVIGIGDNALKINWYKKG

4. Una partícula de flavivirus o una partícula similar a virus (VLP) que comprende la glicoproteína E de cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
5. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la glicoproteína E de cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
6. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la partícula de flavivirus o VLP de la reivindicación 4.
7. Una composición que comprende la glicoproteína E de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en un portador farmacéuticamente aceptable.
8. Una composición que comprende la molécula de ácido nucleico de las reivindicaciones 5 o 6 en un portador farmacéuticamente aceptable.

9. La glicoproteína E de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, la partícula de flavivirus de la reivindicación 4, la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 5-6 y/o la composición de cualquiera de las reivindicaciones 7-8 y cualquier combinación de las mismas para su uso para producir un respuesta inmunitaria a un virus del dengue en un sujeto o tratar o prevenir una infección por el virus del dengue en un sujeto o para proteger a un sujeto de los efectos de la infección por el virus del dengue.
- 5

FIG. 1

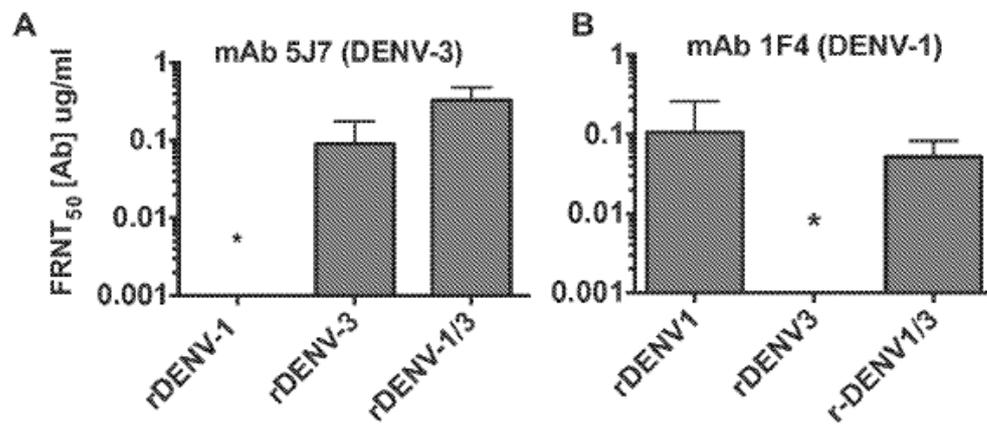


FIG. 2A

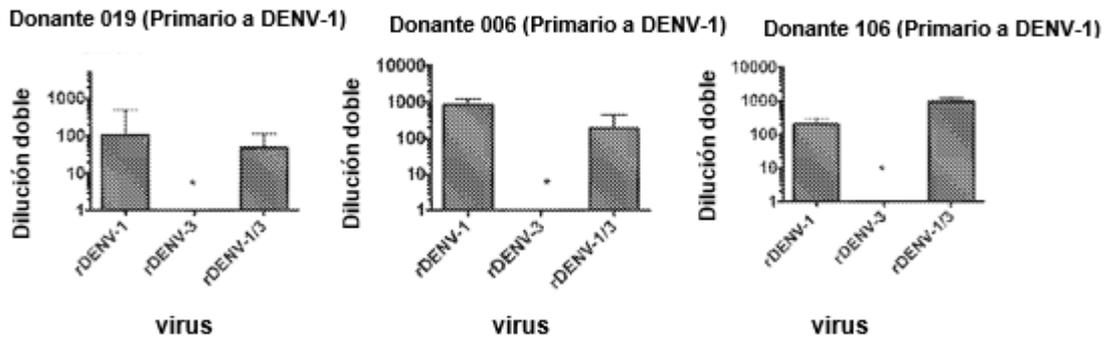
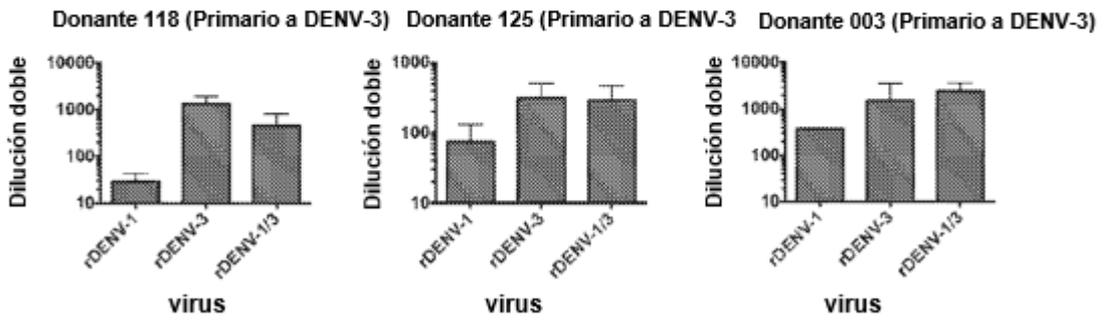


FIG. 2B



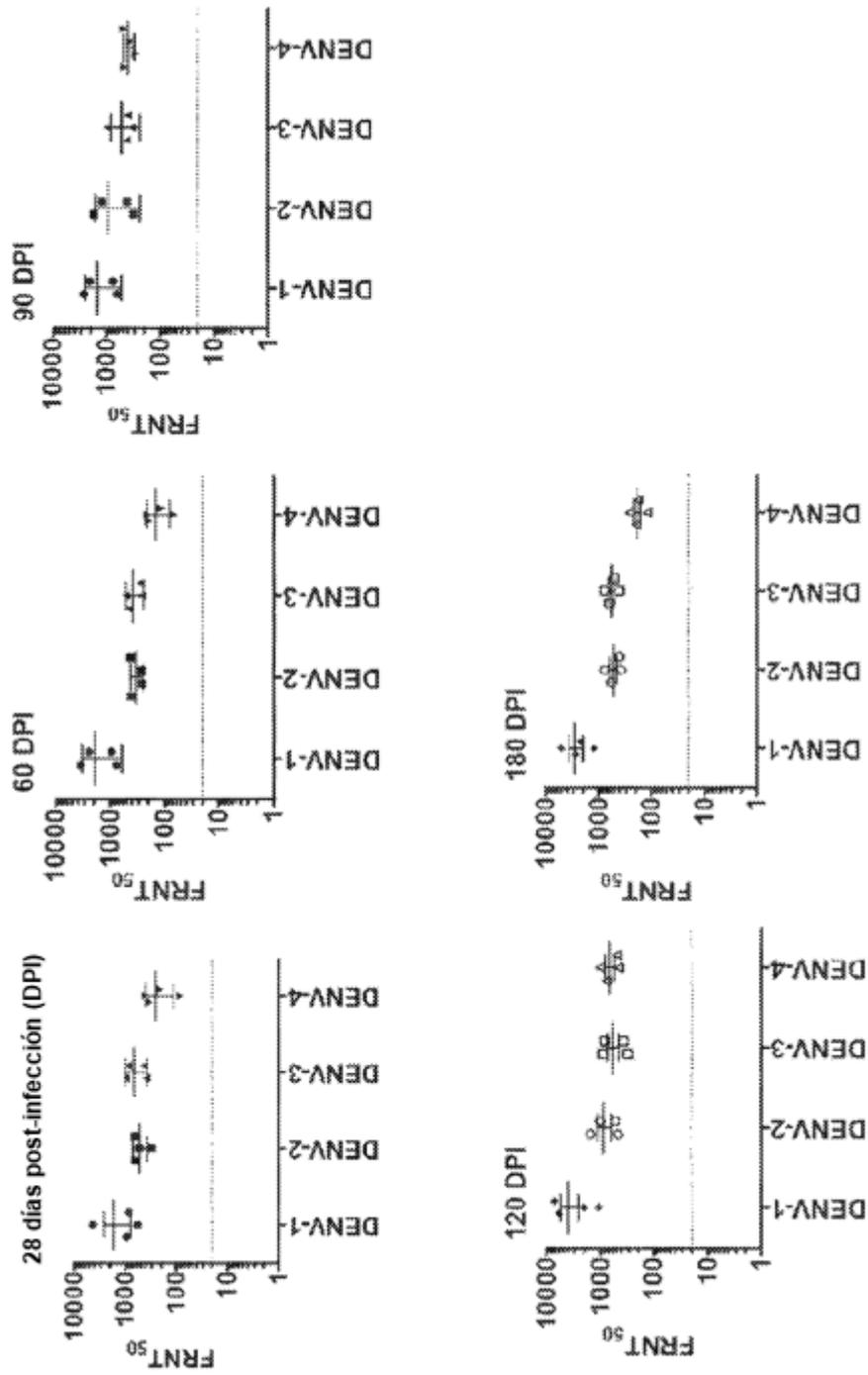


FIG. 3

FIG. 4A

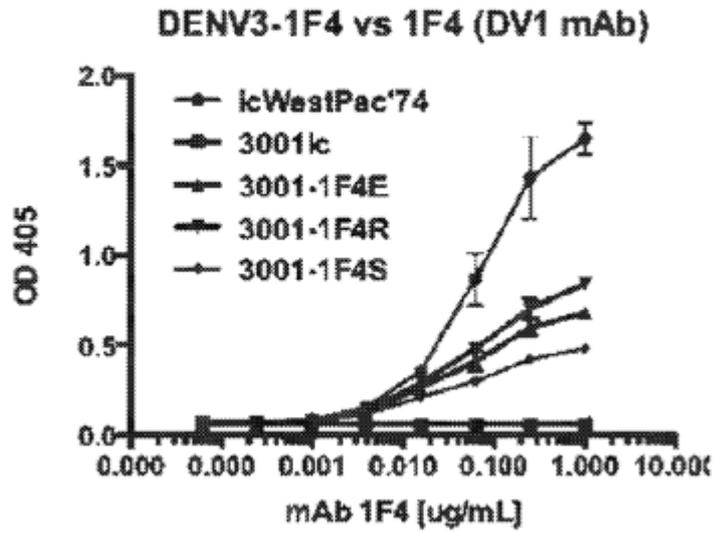
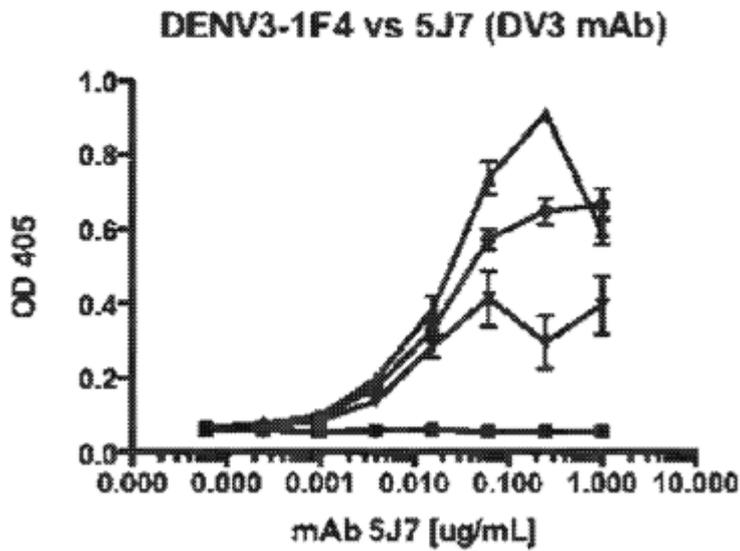


FIG. 4B



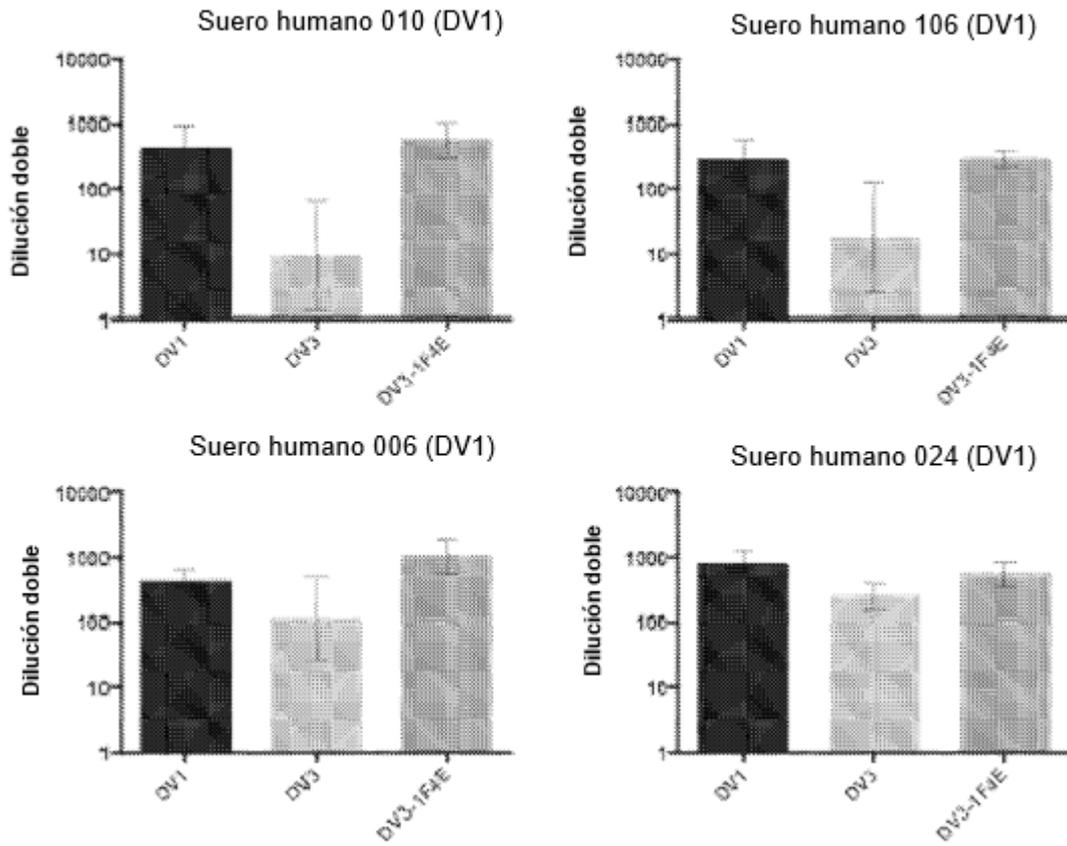


FIG. 5A

FIG. 5B

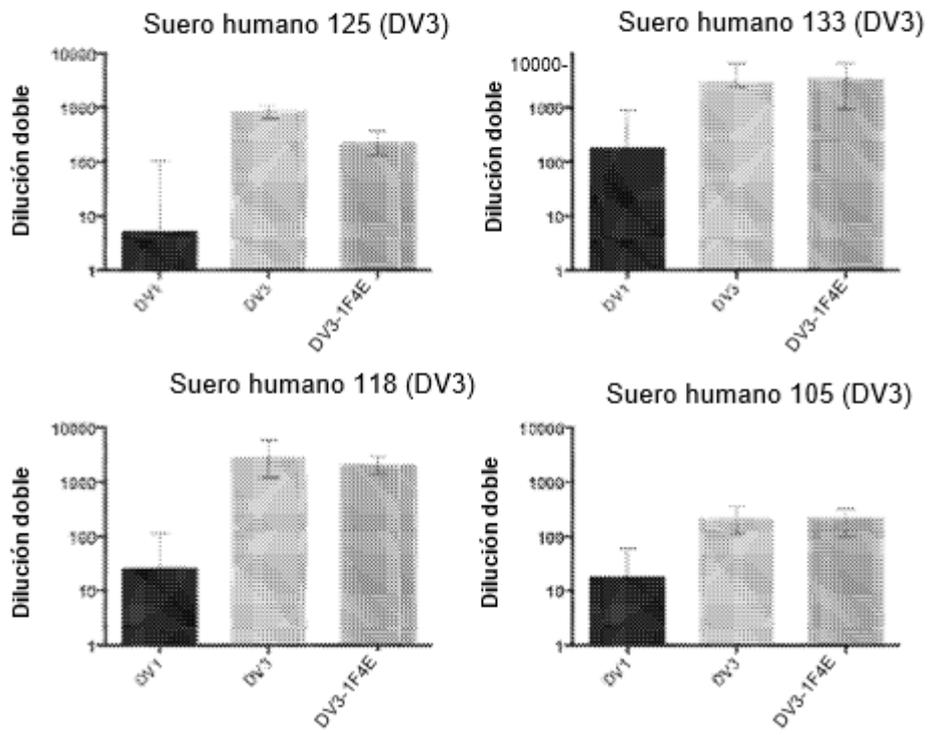


FIG. 6

