COMPOSICION VACUNAL CONTRA EL VIRUS DENGUE

Campo de la técnica

La presente invención está relacionada con el campo de la biotecnología y la industria farmacéutica, en particular con la obtención de una formulación vacunal contra el virus dengue (VD) basada en antígenos proteicos recombinantes y un oligonucleótido de secuencia definida.

Estado de la técnica anterior

El dengue es la enfermedad viral transmitida por artrópodos más ampliamente difundida que afecta a la población humana. Cada año se informan entre 50 y 100 millones de casos de Fiebre del Dengue, 500 000 de los cuales resultan en la forma más severa de la enfermedad, conocida como Fiebre Hemorrágica del Dengue (Guzman y cols., Lancet Infect.Dis. 2002; 2:33-42). El agente causal de esta enfermedad es el VD, que pertenece a la familia *Flaviviridae*, género *flavivirus*. El VD es un complejo viral formado por cuatro serotipos. Es un virus envuelto cuya membrana lipídica contiene dos de sus tres proteínas estructurales: la proteína de la envoltura y la proteína de la membrana. Esta envoltura lipoproteíca rodea a una nucleocápsida icosaédrica compuesta por la tercera de sus proteínas estructurales, *la proteína de la cápsida* (Leyssen y cols., Clin.Microbiol.Rev. 2000; 13:67-82).

En las últimas décadas, la expansión global de las infecciones con estos virus ha convertido al desarrollo de una vacuna efectiva, en una prioridad de la salud pública. Este propósito se ha visto limitado por varios factores. Primeramente, la infección por un serotipo no induce protección cruzada de larga duración contra los restantes serotipos (Leyssen y cols., Clin.Microbiol.Rev. 2000; 13:67-82) y, a la vez, las infecciones secundarias heterotípicas son el principal factor de riesgo para el desarrollo de las formas severas de la enfermedad (Guzman y cols., Lancet Infect.Dis. 2002; 2:33-42; Mongkolsapaya y cols., Nat.Med. 2003; 9:921-927). Por tanto, una vacuna ideal contra el VD debe inducir inmunidad protectora de larga duración contra los cuatro serotipos virales (VD1, VD2, VD3 y VD4).

Los candidatos vacunales que se encuentran actualmente en fases más avanzadas de desarrollo están constituidos por cepas virales atenuadas mediante pases seriados en cultivos celulares o por vía recombinante. Estos candidatos tienen como limitación fundamental la interferencia viral entre los cuatro serotipos en las

formulaciones tetravalentes, por lo que se hace muy complejo controlar la inducción de una respuesta inmune equivalente, y hay que administrar dosis vacunales con largos intervalos de tiempo entre ellas (Bhamarapravati y cols., Vaccine. 2000; 18:44-47; Kanesa-Thasan y cols., Vaccine. 2001; 19:3179-3188; Morrison y cols., J.Infect.Dis. 2010; 201:370-377). Además, debido a su naturaleza de ser virus vivos, no es posible administrarlos en niños menores de un año de edad.

Como una alternativa atractiva, se han desarrollado una serie de estudios preclínicos basados en vacunas de subunidades. Este enfoque presenta tres ventajas fundamentales sobre la vacunación con virus vivos atenuados: 1) son vacunas potencialmente seguras, 2) no debe ocurrir el fenómeno de interferencia viral por la naturaleza no replicativa del inmunógeno y 3) se pueden proponer esquemas cortos de vacunación, contrario a lo que ocurre con las administraciones de virus vivos atenuados, que requieren largos intervalos entre las dosis vacunales para lograr efecto refuerzo.

Uno de los candidatos de vacunas por subunidades más promisorios, es el que se desarrolla por la compañía Hawai Biotec/Merck (Hombach, Rev.Panam.Salud Publica. 2007; 21:254-260). Se trata de un candidato formado por las cuatro proteínas de la envoltura viral expresadas en células de insectos. Formulaciones monovalentes y tetravalentes se han evaluado en ratones y monos, con resultados de inmunogenicidad comparables con los obtenidos con los virus vivos atenuados (Clements y cols., Vaccine. 2010; 28:2705-2715). Sin embargo, en el caso de las formulaciones monovalentes, se requirieron potentes adyuvantes, aún no licenciados para uso en humanos, para lograr la respuesta inmune adecuada. A su vez, la formulación tetravalente ensayada en primates no humanos, además de presentar un adyuvante aún no licenciado en humanos, contenía la proteína NS1 del VD2, con posible homología con células endoteliales humanas, y podría desencadenar un fenómeno de autoinmunidad. Adicionalmente, no existen datos acerca de la inducción de respuesta inmune mediada por células, una rama del sistema inmune que recientemente se identifica con papel protector contra el dengue (Gil y cols., Viral Immunol. 2009; 22:23-30; Yauch y cols., J.Immunol. 2009; 182:4865-4873; Yauch y cols., J.Immunol. 2010; 185:5405-5416).

Manteniendo las ventajas asociadas a las vacunas por subunidades y a su vez buscando formulaciones más inmunogénicas que empleen la alúmina como adyuvante base, un grupo de investigadores cubanos ha desarrollado una línea de

trabajo basada en la proteína de la cápsida y el dominio III (DomIII) de la proteína de la envoltura del VD (Guzman y cols., Exp.Rev.Vaccines. 2010; 9:137-147).

La proteína de la cápsida del VD resulta esencial en el ensamblaje del virión, y tiene como función principal proteger el genoma viral. Su peso molecular es de 9 a 12 kDa (112-127 aminoácidos) y presenta un marcado carácter básico, ya que el 25% de sus aminoácidos son arginina y lisina. La proteína se encuentra totalmente interna en la estructura del virión, sin ninguna región expuesta (Kuhn y cols., Cell. 2002; 108:717-725), lo que la hace sumamente atractiva para formar parte de una vacuna, pues teóricamente no debe ser blanco de anticuerpos inmunoamplificadores. Por otra parte, se han descrito varios epitopos CTL para humanos en su secuencia, lo que permitiría la inducción de una respuesta inmune celular efectiva contra el virus (Gagnon y cols., J.Virol. 1996; 70:141-147; Gagnon y cols., J.Virol. 1999; 73:3623-3629).

A pesar de existir varios estudios sobre las características estructurales de esta proteína, no fue hasta el año 2007 que se evaluó por primera vez la inmunogenicidad de la proteína de la cápsida del VD en ratones. En este estudio se obtuvo la proteína de la cápsida del VD2 por vía recombinante en *Escherichia coli*. Tras un proceso de semipurificación se realizó un esquema de inmunización en ratones, y se obtuvo protección parcial en los ratones tras el reto intracraneal con VD2 infectivo, sin la detección de anticuerpos neutralizantes (Lazo y cols., Vaccine. 2007; 25:1064-1070). Posteriormente, se desarrolló un proceso de purificación y agregación *in vitro* de dicha molécula a escala de laboratorio, y se volvió a ensayar en ratones para medir la respuesta inmune protectora, así como los mecanismos inmunológicos relacionados con su funcionalidad (Lopez y cols., Arch.Virol. 2009; 154:695-698). El análisis de inmunogenicidad reveló la inducción de una respuesta inmune celular, medida por secreción de interferón gamma (IFN-γ), proveniente de las células del bazo de los ratones que recibieron la forma agregada de la proteína. Dicha secreción fue dependiente de células $CD4^+$ y $CD8^+$. A su vez, tras el reto con VD2 infectivo, se obtuvo protección significativa en los animales inmunizados con la variante agregada de la proteína, y dicha protección también fue dependiente de las células $CD4^+$ y $CD8^+$ (Gil y cols., Int.Immunol. 2009; 21:1175-1183). Basado en los resultados antes descritos, se propuso entonces combinar, en una misma construcción genética, la proteína de la cápsida del VD2 con la región del DomIII de la proteína de la envoltura del mismo serotipo viral. El DomIII ha sido ampliamente

descrito como una región que involucra la unión al receptor celular (Chen y cols., J.Virol. 1996; 70:8765-8772) y, adicionalmente, se ha demostrado la inducción de respuesta inmune neutralizante y protectora en ratones inmunizados con proteínas de fusión conteniendo dicha región (Crill y cols., J.Virol. 2001; 75:7769-7773; Hermida y cols., J.Virol.Methods. 2004; 115:41-49; Simmons y cols., Am.J.Trop.Med.Hyg. 2001; 65:159-161). A su vez, en estudios realizados en primates no humanos, se demostró la inducción de respuesta inmune funcional protectora únicamente al emplear el adyuvante de Freund (Hermida y cols., Vaccine. 2006; 24:3165-3171).

La unión de las regiones virales de la cápsida y el DomIIII de la envoltura viral permite la presencia de dos regiones potencialmente protectoras en una misma molécula, capaz de inducir a la vez anticuerpos neutralizantes (DomIII) y respuesta inmune celular (cápsida). Se obtuvo entonces la construcción genética denominada DIIIC-2 (DomIII fusionado a la región N-terminal de la proteína de la cápsida, serotipo 2), la cual se expresó en la bacteria *E. coli;* y la proteína resultante se purificó a escala de laboratorio, y se sometió al proceso de agregación con una mezcla de oligonucleótidos de secuencia desconocida. Tras la administración de tres dosis en ratones, se pudo detectar la presencia de anticuerpos antivirales y neutralizantes. De manera similar, se pudo medir la secreción de IFN-γ en los esplenocitos de los animales inmunizados, detectándose niveles significativos en los animales que recibieron la variante agregada. En congruencia con la respuesta inmune celular, se obtuvo protección significativa tras el reto intracraneal, y dicha protección dependió de las células $CD4^+$ y $CD8^+$ inducidas durante el proceso de inmunización (Valdes y cols., Virology. 2009; 394:249-258). Estos resultados, en su conjunto, permitieron seleccionar la forma agregada de la proteína DIIIC-2 para los estudios siguientes en primates no humanos.

El primer estudio en primates no humanos se realizó en animales previamente infectados con VD2 para conocer la capacidad refuerzo de la proteína. Acorde a lo esperado, al administrar la proteína DIIIC-2 tres meses después de la infección viral, los animales desarrollaron altos niveles de anticuerpos antivirales neutralizantes al virus homólogo, lo cual indica la presencia de epitopos funcionales en la proteína recombinante (Valdes y cols., Clin.Vaccine Immunol. 2011; 18:455-459).

Con anterioridad a esta invención, era conocido que la adición de oligonucleótidos para formar variantes agregadas de la proteína DIIIC-2 favorecía la respuesta

inmune celular, y la protección contra del virus homólogo en ratones (Valdes y cols., Virology. 2009; 394:249-258). Sin embargo, no se conocía si la secuencia del oligonucleótido empleado influía en la calidad de la respuesta inmune que se induce.

De acuerdo a los elementos previamente referidos, el desarrollo de una vacuna contra el VD capaz de inducir una respuesta inmune segura y efectiva contra los cuatro serotipos de este patógeno es un problema no resuelto. La presente invención se dirige precisamente a este objetivo.

Explicación de la invención

La presente invención resuelve el problema antes planteado, al proveer de una composición vacunal que se caracteriza porque comprende a) al menos un antígeno que comprende al menos el 50% de la secuencia de la proteína de la cápsida del VD y b) el oligonucleótido identificado como SEQ ID NO. 1. En una realización de la invención, la composición vacunal se caracteriza porque el antígeno que comprende al menos el 50% de la secuencia de la proteína de la cápsida del VD es un antígeno recombinante que comprende los aminoácidos 1 al 99 de dicha proteína. En una materialización, la composición vacunal de la invención comprende un antígeno quimérico que comprende los aminoácidos 1 al 99 de la proteína de la cápsida, y los aminoácidos 286 al 426 de la región del DomIII de la proteína de la envoltura viral. En una realización particular, dichos antígenos recombinantes se seleccionan dentro del grupo compuesto por SEQ ID NO. 5 (antígeno DIIIC-1), SEQ ID NO. 6 (antígeno DIIIC-2), SEQ ID NO. 7 (antígeno DIIIC-3), y SEQ ID No. 8 (antígeno DIIIC-4).

Para demostrar si en dependencia del tipo de oligonucleótido que se emplee para la agregación de las proteínas, se induce la mejor respuesta inmune, se seleccionó la composición correspondiente al serotipo 2 como modelo. Para ello, la proteína DIIIC-2 (antígeno quimérico que comprende el DomIII de la proteína de la envoltura viral y los aminoácidos 1 al 99 de la proteína de la cápsida del VD2) se precipitó en presencia de varios oligonucleótidos de secuencia conocida, descritos en el estado del arte. Se conoce que algunos de estos oligonucleótidos poseen capacidad adyuvante (Klinman, Int.Rev.Immunol. 2006; 25:1-20; Vollmer, Int.Rev.Immunol. 2006; 25:125-134). Se incluyó además un nuevo oligonucleótido, formado por la fusión de dos de los oligonucleótidos mencionados (Krug y cols., Eur.J.Immunol. 2001; 31:2154-2163; Verthelyi y cols., J.Immunol. 2001; 166:2372-2377). Tras la

evaluación de la inmunogenicidad en ratones se pudo comprobar que el nuevo oligonucleótido (SEQ ID NO. 1) favoreció la mejor respuesta celular, medida por secreción de IFN-γ, por lo que se seleccionó este para determinar la capacidad protectora frente al reto con el virus homólogo letal en el modelo de encefalitis viral en ratones. Como resultado, se obtuvo que tanto por porcentaje de sobrevida como por disminución de los niveles de viremia en cerebro, la formulación de DIIIC-2 con el oligonucleótido de SEQ ID NO. 1, adyuvada en alúmina, generó una potente respuesta inmune protectora en ratones.

Por tanto, en la presente invención se demuestra, por primera vez, que la naturaleza del oligonucleótido es crucial en la inducción de la respuesta inmune efectora celular, y consecuentemente en la capacidad protectora de la proteína recombinante. A pesar de ensayar varios oligonucleótidos, solo uno de ellos, el oligonucleótido cuya secuencia se identifica como SEQ ID NO. 1, resultó ser el mejor en términos de inducción de respuesta inmune celular y protección. Se probaron varios oligonucleótidos sintéticos de secuencias diferentes, que contenían o no motivos CpG y tenían enlaces fosfodiéster en sus estructuras. Este último elemento difiere respecto a los oligonucleótidos con actividad inmunopotenciadora descritos en la literatura, pues los enlaces que se emplean para la síntesis de estos oligonucleótidos son del tipo fosforotioato, con la finalidad de protegerlos de la degradación por exonucleasas. Adicionalmente, se probaron varias tallas, tales como 19, 20 y 39 bases. Este último oligonucleótido de 39 bases contiene un número de motivos CpG, y en una disposición dentro de la secuencia, que no permite incluirlo dentro las clasificaciones descritas para los oligonucleótidos con actividad inmunopotenciadora en el estado del arte.

Por otro lado, en todos los casos estas moléculas se emplearon para la agregación de los antígenos recombinantes, por lo que se adicionaron cantidades mínimas de las mismas. Este constituye otro elemento de diferencia con respecto a los oligonucleótidos empleados como agentes estimuladores del sistema inmune, pues se requieren grandes cantidades de los mismos para ejercer esa función (Riedl y cols., J.Immunol. 2002; 168:4951-4959).

Como se explicó anteriormente, luego de la evaluación inmunológica en ratones se demostró que, inesperadamente, el oligonucleótido cuya secuencia se identifica como SEQ ID NO. 1 potenció, de manera significativa, la respuesta inmune celular y

protectora que se induce con la proteína recombinante DIIIC-2, con diferencias notables respecto al resto de los oligonucleótidos empleados.

Seguidamente, se procedió a probar el concepto en primates no humanos negativos a dengue. Para ello, los animales recibieron cuatro dosis de la formulación agregada de DIIIC-2 con el oligonucleótido de SEQ ID NO. 1, adyuvada en alúmina. Adicionalmente, se incluyó un grupo de animales inmunizados con un antígeno recombinante que comprende los aminoácidos 1 al 99 de la proteína de la cápsida del VD2, que al ser incubada con el oligonucleótido de SEQ ID NO. 1 forma partículas semejantes a nucleocápsidas (PSNs-2). Se determinó la respuesta de anticuerpos antivirales y anti-proteínas recombinantes, además de la funcionalidad de esta respuesta, mediante un ensayo de neutralización por reducción del número de placas virales, empleado diferentes cepas de VD2 y diferentes líneas celulares para el ensayo. Por otra parte, se evaluó la respuesta celular generada a través de la determinación de los niveles de secreción de IFN-γ, tras la estimulación *in vitro* de las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) con VD2 infectivo. Posteriormente, los animales fueron retados con el VD2, y se determinó la presencia del virus en la sangre. Como resultado, se obtuvo que la proteína indujo en los monos una respuesta de anticuerpos con actividad neutralizante robusta, medida por seis sistemas diferentes (100% de seroconversión), así como una respuesta celular adecuada, mediada por la secreción de IFN-γ, antes y después del reto con el virus. En congruencia con los resultados de inmunogenicidad, los animales vacunados se protegieron significativamente frente al reto viral, ya que en dos de los tres animales inmunizados no se aisló el virus en ningún día después del reto, y el tercero solo presentó un día de viremia con valores menores a 10 unidades formadoras de placas por mililitro (ufp/mL).

Este estudio en primates no humanos, previamente negativos a dengue, constituye el primer estudio sobre la capacidad protectora de una proteína recombinante que contiene la región de la cápsida viral del VD. Este hallazgo permitió extrapolar estas condiciones al resto de las proteínas quiméricas que se obtuvieron, correspondientes a los serotipos 1, 3 y 4.

Seguidamente, se diseñaron y obtuvieron las proteínas recombinantes correspondientes a los serotipos 1, 3 y 4, las cuales se denominaron DIIIC-1, DIIIC-3 y DIIIC-4, respectivamente. Todas las moléculas se obtuvieron en *E. coli* con porcentajes de expresión adecuados. A su vez, éstas se purificaron y se

reconocieron por anticuerpos policlonales murinos específicos contra el serotipo homólogo. Adicionalmente, se pudo determinar la correcta formación del puente disulfuro en cada proteína, tanto por espectrometría de masa (para DIIIC-1, DIIIC-2, DIIIC-3 y DIIIC-4) como por pérdida de reconocimiento frente al suero policlonal murino, luego de la reducción-carboximetilación de las cisteínas del puente disulfuro intracatenario del DomIII (para DIIIC-1, DIIIC-2 y DIIIC-4).

En los estudios que se incluyen en la presente invención se pudo demostrar que las proteínas quiméricas DIIIC de estos serotipos (1, 3 y 4), las cuales se describen por primera vez, también inducen respuesta inmune funcional y protectora en ratones contra los serotipos homólogos. Adicionalmente, se comprueba que la mezcla de las cuatro proteínas quiméricas, previamente formuladas con el oligonucleótido de SEQ ID NO. 1 y adyuvadas en alúmina, induce respuesta a los cuatro serotipos, tanto celular, humoral, como protectora en ratones, sin existir el fenómeno de competencia antigénica.

Las cuatro proteínas quiméricas DIIIC-1, DIIIC-2, DIIIC-3 y DIIIC-4 se agregaron al adicionar el oligonucleótido de SEQ ID NO. 1, y posteriormente se adyuvaron en presencia de alúmina, para su posterior evaluación en ratones. Tras la administración de tres dosis, se pudo detectar la presencia de anticuerpos antivirales contra los cuatro serotipos en el 100% de los animales inmunizados. De manera similar, se detectó actividad neutralizante en los sueros de éstos ratones, medida contra los cuatro serotipos. En concordancia con este resultado, al realizar el reto viral intracraneal con los serotipos 1 y 4 se obtuvo protección significativa en los dos casos, quedando así probado el concepto en ratones de la funcionalidad de las formulaciones monovalentes y la tetravalente ensayada.

La formulación tetravalente fue también capaz de inducir en monos una respuesta inmune funcional, tanto de tipo humoral como celular. Para la evaluación de la inmunogenicidad de esta formulación se procedió al segundo ensayo en primates no humanos, negativos a dengue. Los animales recibieron la formulación tetravalente en tres ocasiones, por diferentes vías, según el grupo de estudio, y un mes tras la última dosis se determinó la respuesta inmune humoral y celular inducida. Como resultado, se obtuvo que en el 100% de los monos se generó respuesta inmune antiviral, de anticuerpos neutralizantes, contra todos los serotipos virales. También el ensayo de respuesta inmune celular reveló la inducción de respuesta positiva en todos los animales estudiados.

Este trabajo, en su conjunto, demuestra la capacidad protectora, contra los cuatro serotipos de VD, de las cuatro proteínas DIIIC agregadas con el oligonucleótido de SEQ ID NO. 1.

La invención también comprende una composición vacunal que se caracteriza porque comprende dos de los antígenos quiméricos que se seleccionan dentro del grupo compuesto por SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7, y SEQ ID No. 8. Es también objeto de la invención una composición vacunal que se caracteriza porque comprende los cuatro antígenos quiméricos identificados como SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7, y SEQ ID No. 8.

En otro aspecto, la invención provee un ácido nucleico que se caracteriza por la secuencia identificada como SEQ ID NO. 1. Como se demuestra ampliamente en la invención, dicho ácido nucleico es útil para incrementar la respuesta inmune contra un antígeno vacunal que comprende al menos el 50% de la secuencia de la proteína de la cápsida del VD. En una materialización de la invención, se demuestra el uso del ácido nucleico identificado como SEQ ID NO. 1 para incrementar la respuesta inmune contra un antígeno recombinante que comprende los aminoácidos 1 al 99 de la proteína de la cápsida del VD. En una realización particular, se revela el uso del ácido nucleico identificado como SEQ ID NO. 1 para incrementar la respuesta inmune contra los antígenos quiméricos que se identifican como SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7, y SEQ ID No. 8.

Adicionalmente, es objeto de la presente invención un método de inducir respuesta inmune contra el VD que se caracteriza porque se administra a un sujeto una composición vacunal que comprende a) al menos un antígeno que comprende al menos el 50% de la secuencia de la proteína de la cápsida del VD y b) el oligonucleótido identificado como SEQ ID NO. 1. En un aspecto, la invención provee un método de inducir respuesta inmune contra el VD que se caracteriza porque se administra una composición que comprende un antígeno recombinante que comprende los aminoácidos 1 al 99 de dicha proteína. En una materialización de dicho método, el antígeno recombinante es un antígeno quimérico que posee una secuencia de aminoácidos que se selecciona dentro del grupo compuesto por SEQ ID NO. 5, la SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7, y SEQ ID No. 8.

En la invención se realizó un estudio en ratones con el objetivo de disminuir el total de dosis de cada proteína DIIIC en el esquema de inmunización. Para ello, se administraron dos formulaciones bivalentes diferentes, administradas de manera

secuencial, y se administró una tercera dosis refuerzo. Como resultado, se obtuvo que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ensayados, para ninguno de los 4 serotipos virales, lo cual indica que es posible, a través de administraciones secuenciales de formulaciones bivalentes, y refuerzo con la formulación tetravalente DIIIC, que incluye el oligonucleótido de SEQ ID NO. 1, obtener los mismos niveles de inmunogenicidad que administrando tres dosis de la formulación tetravalente DIIIC con el oligonucleótido de SEQ ID NO. 1. Por tanto, es también objeto de la invención un método de inducir respuesta inmune contra el VD donde las composiciones vacunales que comprenden los antígenos quiméricos identificados como SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7 y SEQ ID No. 8 se administran de manera secuencial en composiciones bivalentes. La invención también provee un método donde adicionalmente se administra una dosis de refuerzo que comprende la composición tetravalente de los cuatro antígenos quiméricos identificados como SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7 y SEQ ID No. 8.

Como se demuestra en los Ejemplos, las composiciones que comprenden al menos un antígeno que comprende al menos el 50% de la secuencia de la proteína de la cápsida del VD y el oligonucleótido identificado como SEQ ID NO. 1 fueron inmunogénicas por diferentes vías, por lo que en el método de la invención la composición vacunal se administra por las rutas que son bien conocidas por aquellos versados en este campo de la técnica, por ejemplo la ruta subcutánea, la intradérmica o la intramuscular.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Gráfico de la respuesta de anticuerpos antivirales en los animales inmunizados. En el eje de las Y se representa el log Título anti VD2 y en el eje de las X los grupos de animales que recibieron las diferentes variantes de formulaciones de DIIIC-2. Los títulos se determinaron mediante un ELISA amplificado de captura, usando el virus como antígeno. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba de Kruskal-Wallis y la comparación múltiple *a posteriori* mediante la prueba de Dunn. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre los grupos. Los datos se presentan como la media ± la desviación estándar.

Figura 2. Gráfico que representa la concentración de IFN-γ medida por ELISA, tras la estimulación *in vitro* de esplenocitos provenientes de los ratones inmunizados con las diferentes formulaciones de DIIIC-2, cultivados con el VD2 o con una preparación control negativo (mock). En el eje de las Y se representa la concentración de IFN-γ (pg/mL). En el eje de las X se representan los grupos que recibieron las diferentes formulaciones de DIIIC-2. Los porcentajes reflejados encima de cada conjunto de puntos representa el porciento de animales respondedores. La línea discontinua indica el valor por encima del cual se considera una respuesta positiva. El análisis estadístico se realizó usando un ANOVA de clasificación simple, y para las comparaciones múltiples entre los grupos se realizó una prueba de Tukey. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre los grupos. Los datos se presentan como la media ± la desviación estándar (n=8).

Figura 3. Gráfico que representa los ensayos de protección contra el VD2. **A.** Curvas de sobrevida de los ratones inmunizados tras el reto intracraneal con una cepa letal de VD2. El eje de las Y representa el porcentaje de sobrevida, y el eje de las X representa el tiempo de observación tras el reto intracraneal. **B.** Cuantificación viral en células VERO, medida a partir de cerebro infectado el día 7 post reto. El eje de las Y representa el número de ufp/mL obtenidas tras el plaqueo en células VERO de homogenado de cerebro de ratón infectado. El eje de las X representa los grupos de estudio. Para la curva de sobrevida, el análisis estadístico se realizó según la prueba de sobrevida Log-rank. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre los grupos. Los datos son representativos de dos experimentos independientes (n=10). Para la carga viral, el análisis estadístico se realizó mediante una prueba de Kruskal-Wallis y la comparación múltiple *a posteriori* mediante la prueba de Dunn. Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre los grupos. Los datos se presentan como la media ± la desviación estándar (n=5). La línea discontinua indica las 100 ufp/ml.

Figura 4. Gráfico que representa la cinética de anticuerpos anti-DIIIC-2 generados en monos, y medida por ELISA. En el eje de las Y se representa el Log Título y en el eje de las X se representa el tiempo, en días, durante el ensayo. Las flechas negras indican el momento de cada inmunización.

Figura 5. Gráfico que representa la cinética de anticuerpos anti-VD, medida por un ELISA de captura, en los monos inmunizados con la preparación placebo (**A**), con la proteína DIIIC-2 agregada (**B**) o con las PSNs-2 (**C**). El eje de las Y se representa el log 1/título, y en el eje de las X se representa el tiempo en días durante el ensayo. Las flechas negras indican el momento de cada inmunización y la flecha discontinua indica el día del reto viral.

Figura 6. Gráfico que representa la concentración de IFN-γ tras la estimulación *in vitro* medida por ELISA, de las células mononucleares de sangre periférica provenientes de los monos que recibieron la preparación placebo o la proteína DIIIC-2. En el eje de las Y se representa la concentración de IFN-γ (pg/mL) y en el eje de las X se representa el tiempo de realización del ensayo. Las CMSP provenientes de los monos inmunizados se cultivaron con VD2 o con una preparación control negativo (*mock*). Los datos se presentan como la media ± la desviación estándar (n=3). La línea discontinua indica el valor por encima del cual se considera una respuesta positiva.

Figura 7. Gráficos que representan la carga viral presente en el suero de los monos del grupo inmunizado con la formulación Placebo (**A**), la proteína DIIIC-2 agregada (**B**) o las PSNs-2 (**C**), medida por plaqueo directo en células VERO. El eje de la derecha se corresponde con las cargas detectadas en los monos 2, 5 y 9 (línea discontinua). El eje de la izquierda se corresponde con las cargas detectadas en el resto de los animales. En el eje de las X se representa el tiempo (en días) posteriores al reto.

Figura 8. Estrategia de clonaje para la obtención de las construcciones genéticas pDIIIC-1, pDIIIC-2, pDIIIC-3 y pDIIIC-4.

Figura 9. Gráfico que representa niveles de reconocimiento de las proteínas quiméricas DIIIC, en condiciones reductoras y no reductoras, por anticuerpos policlonales de ratón con altos títulos neutralizantes al serotipo homólogo, determinados por ELISA. En el eje de las Y se representan los valores de absorbancia, y en el eje de las X se representan las proteínas ensayadas.

Figura 10. Gráfico de la respuesta de anticuerpos antivirales en los animales inmunizados, medidos 15 días tras la última inmunización. En el eje de las Y se representa el log Título anti-VD, y en el eje de las X se representan los grupos de animales que recibieron cada formulación. (**A**) Respuesta de anticuerpos anti-VD1,

(**B**) respuesta de anticuerpos anti-VD2, (**C**) respuesta de anticuerpos anti-VD3 y (**D**) respuesta de anticuerpos anti-VD4. Los títulos se determinaron mediante un ELISA amplificado de captura, usando cada virus como antígeno. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba de Kruskal-Wallis, y la comparación múltiple *a posteriori* mediante la prueba de Dunn. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Los datos se presentan como la media ± la desviación estándar (n=10).

Figura 11. Gráfico que representa la concentración de IFN-γ, medida por ELISA, tras la estimulación *in vitro* de esplenocitos provenientes de los ratones inmunizados con las formulaciones monovalentes y tetravalente DIIIC (que incluyen el oligonucleótido de SEQ ID NO. 1) o con la formulación placebo, y estimulados con cada proteína DIIIC. En el eje de las Y se representa la concentración de IFN-γ (pg/mL). En el eje de las X se representan los grupos del estudio. Los datos se presentan como la media ± la desviación estándar.

Figura 12. Gráfico que representa las curvas de sobrevida de los ratones inmunizados, tras el reto intracraneal con una cepa letal de virus VD1(**A**) y virus VD4 (**B**). El eje de las Y representa el porcentaje de sobrevida, y el eje de las X representa el tiempo de observación tras el reto intracraneal. El análisis estadístico se realizó según la prueba de sobrevida Log-rank. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre los grupos. Los datos son representativos de dos experimentos independientes (n=9).

Figura 13. Gráfico que representa la respuesta de anticuerpos antivirales contra los cuatro serotipos del VD, determinada mediante un ELISA de captura, luego de tres dosis de la formulación tetravalente DIIIC con el oligonucleótido de SEQ ID NO. 1 en primates no humanos, empleando las vías subcutánea (SC), intradérmica (ID) e intramuscular (IM). En el eje de las Y se representa el Log Título anti VD y en el eje de las X los grupos de animales.

Figura 14. Gráfico que representa la frecuencia de células productoras de IFN-γ a partir de los linfocitos de sangre periférica estimulados *in vitro* con las proteínas recombinantes DIIIC, luego de tres dosis de la formulación tetravalente DIIIC con el oligonucleótido de SEQ ID NO. 1, en primates no humanos. En el eje de las Y se representa la frecuencia de células productoras de IFN-γ, en número de spots/mL. En el eje de las X se representan los grupos de animales.

Figura 15. Gráfico de la respuesta de anticuerpos antivirales en los animales inmunizados, medidos 15 días tras la última inmunización. En el eje de las Y se representa el log Titulo anti-VD, y en el eje de las X se representan los grupos de animales que recibieron cada formulación. (**A**) Respuesta de anticuerpos anti-VD1, (**B**) respuesta de anticuerpos anti-VD2, (**C**) respuesta de anticuerpos anti-VD3 y (**D**) respuesta de anticuerpos anti-VD4. Los títulos se determinaron mediante un ELISA amplificado de captura, usando cada virus como antígeno. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba de Kruskal-Wallis y la comparación múltiple *a posteriori* mediante la prueba de Dunn. Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre los grupos. Los datos se presentan como la media ± la desviación estándar (n=10).

Figura 16. Gráfico que representa la concentración de IFN-γ, medida por ELISA, tras la estimulación *in vitro* de esplenocitos provenientes de los ratones inmunizados y estimulados con cada proteína DIIIC. En el eje de las Y se representa la concentración de IFN-γ (pg/mL). En el eje de las X se representan los grupos del estudio. Los datos se presentan como la media ± la desviación estándar (n=5).

Exposición detallada de modos de realización / Ejemplos de realización

Ejemplo 1. Evaluación de la inmunogenicidad en ratones de la proteína DIIIC-2 agregada con diferentes oligonucleótidos de secuencia definida.

Tomando como base la prueba de concepto realizada en ratones con la proteína DIIIC-2 empleando una mezcla de oligonucleótidos de alrededor de 50 b, de secuencia desconocida, seleccionados al azar para la agregación de la proteína (Valdes y cols., Virology. 2009; 394:249-258), se ensayaron diferentes oligonucleótidos de secuencia definida. A diferencia de lo reportado en la literatura respecto a los oligonucleótidos con capacidad adyuvante, los ensayados en el presente estudio están formados únicamente por enlaces fosfodiester. Se incluyeron, además, dos oligonucleótidos de una extensión de 39 bases, que no se clasifican dentro de los oligonucleótidos que ejercen actividad adyuvante, según se define en la literatura.

Los oligonucleótidos ensayados fueron los siguientes:

Oligonucleótido K3 (SEQ ID NO. 2): ATCGACTCT**CG**AG**CG**TTCTC, 20 mer (contiene motivos CpG para humanos y monos. Esqueleto de enlaces fosfodiester)

Oligonucleótido 2216 (SEQ ID NO. 3): GGGGGA**CG**AT**CG**T**CG**GGGG, 19 mer (contiene motivos CpG para ratones y monos. Esqueleto de enlaces fosfodiester)
Oligonucleótido mixto (SEQ ID NO. 1):
ATCGACTCT**CG**AG**CG**TTCT**CG**GGGGA**CG**AT**CG**T**CG**GGGG, 39 mer (Contiene las secuencias del oligonucleótido K3 y 2216, esqueleto de enlaces fosfodiester)
Oligonucleótido OriC (SEQ ID NO. 4):
CATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTG 39 mer. (Esqueleto de enlaces fosfodiester)
Poli I:C esqueleto de ARN: ICICICICICICICICICICICIC 26 mer. (Esqueleto de enlaces fosfodiester)
Poli I:C esqueleto de ADN: ICICICICICICICICICICICIC 26 mer. (Esqueleto de enlaces fosfodiester)

La reacción de agregación se realizó con una relación de masa de proteína respecto a la masa del oligonucleótido que permitiera la precipitación del 50% de la proteína, para así tener como constante el parámetro de: igual cantidad de proteína soluble y agregada en la formulación.
La proteína DIIIC-2, agregada con los diferentes oligonucleótidos, se evaluó en ratones BALB/c. Los grupos fueron los siguientes:
Grupo 1: DIIIC-2 Soluble (no agregada y sin oligonucleótido) (20 µg proteína)
Grupo 2: DIIIC-2 con oligonucleótido mixto (SEQ ID NO. 1): (20 µg proteína + 2 µg de oligonucleótido)
Grupo 3: DIIIC-2 con oligonucleótido poli:IC, ARN (20 µg proteína + 2 µg de oligonucleótido)
Grupo 4: DIIIC-2 con oligonucleótido poli:IC, ADN (20 µg proteína + 2 µg de oligonucleótido)
Grupo 5: DIIIC-2 con oligonucleótido 2216 (SEQ ID NO. 3) (20 µg proteína + 2 µg de oligonucleótido)
Grupo 6: DIIIC-2 con oligonucleótido K3 (SEQ ID NO. 2) (20 µg proteína + 2 µg de oligonucleótido)
Grupo 7: DIIIC-2 con oligonucleótido OriC (SEQ ID NO. 4) (20 µg proteína + 2 µg de oligonucleótido)
Grupo 8: DIIIC-2 Calentada (control de precipitación sin oligonucleótido) (contiene la mitad de la proteína precipitada (10 µg) y la mitad soluble (10 µg))

Grupo 9: Placebo con oligonucleótido mixto (SEQ ID NO. 1) (2 µg)

Grupo 10: 10^2 ufp de VD2 infectivo

Todas las variantes se formularon en alúmina como adyuvante base, y se inocularon a los animales en un esquema de tres dosis, cada 15 días, por vía intraperitoneal. Después de la tercera dosis, la detección de anticuerpos reactivos al VD2 se determinó mediante un ELISA de captura, a través del cual se determinaron los títulos por dilución a punto final de los sueros de estos animales. Como se aprecia en la Figura 1, se detectaron altos títulos de anticuerpos antivirales para todos los grupos ensayados, sin diferencias estadísticas entre ellos (p>0,05), lo que indica que la agregación de la proteína quimérica DIIIC-2 no afecta la respuesta de anticuerpos antivirales.

Con el objetivo de determinar la funcionalidad de los anticuerpos generados por la inmunización, también se realizó el ensayo de neutralización viral *in vitro*. En la Tabla 1 se representan los títulos neutralizantes contra del VD2. El título neutralizante se define como la dilución máxima en que se alcanza el 50% de reducción del número de placas. Como se puede apreciar, los animales de todos los grupos fueron positivos por neutralización, con un 100% de seroconversión y con Títulos Promedios Geométricos (TPG) mayores de 1:70.

Tabla 1. Desarrollo de anticuerpos neutralizantes contra el VD2 en los grupos ensayados

Grupo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
TPG	153	121	149	73	149	98	107	111	<10	69

También en este esquema se evaluó la capacidad de la proteína DIIIC-2, agregada con diferentes oligonucleótidos, de generar una respuesta inmune mediada por células. Para ello, se extrajeron las células del bazo de los animales inmunizados con cada variante y se midió la secreción de IFN-γ en el sobrenadante de cultivo de los esplenocitos, luego de la estimulación con VD2 infectivo. En la Figura 2 se describen los valores de secreción de la citoquina por cada grupo, y el porcentaje de animales respondedores. A pesar de que se obtuvieron niveles de secreción apreciables en todos los grupos, solamente el grupo inmunizado con la proteína agregada con el oligonucleótido de SEQ ID NO. 1 mostró diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control negativo. Además, en ese

grupo el 100% de los animales respondió positivamente. Teniendo en cuenta tanto el porcentaje de animales respondedores como el valor medio de la concentración de IFN-γ en el ensayo de respuesta inmune celular, se seleccionaron para el ensayo de protección las formulaciones de la proteína DIIIC-2 agregada con los oligonucleótidos: mixto (SEQ ID NO. 1), 2216 (SEQ ID NO. 3), K3 (SEQ ID NO. 2), y Ori C (SEQ ID NO. 4).

Para este estudio, se formaron los siguientes grupos de 15 ratones:

Grupo 1: DIIIC-2 oligonucleótido mixto (SEQ ID NO. 1) (5 µg proteína + 0,5 µg de oligonucleótido)

Grupo 2: DIIIC-2 oligonucleótido 2216 (SEQ ID NO. 3) (5 µg proteína + 0,5 µg de oligonucleótido)

Grupo 3: DIIIC-2 oligonucleótido K3 (SEQ ID NO. 2) (5 µg proteína + 0,5 µg de oligonucleótido)

Grupo 4: DIIIC-2 oligonucleótido OriC (SEQ ID NO. 4) (5 µg proteína + 0,5 µg de oligonucleótido)

Grupo 5: Placebo con oligonucleótido mixto (SEQ ID NO. 1) (0,5 µg)

Grupo 6: 10^2 ufp de VD2 infectivo

Todas las variantes se formularon en alúmina como adyuvante base, y se inocularon a los animales en un esquema de tres dosis, cada 15 días, por vía intraperitoneal. Dos meses después del comienzo del esquema de inmunización, 10 animales de cada grupo se retaron con 50 dosis letal media (DL_{50}) de virus homólogo neuroadaptado, y se observaron durante 21 días para medir la sobrevida. La Figura 3A describe los porcentajes de sobrevida obtenidos. Como se observa, más del 80% de los ratones que recibieron la formulación DIIIC-2 con el oligonucleótido de SEQ ID NO. 1, sobrevivieron al reto viral, sin diferencias estadísticas respecto al grupo control positivo inmunizado con el VD2 (p>0,05). A su vez, solamente el 10% de los animales del grupo control negativo sobrevivieron al reto viral, con diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo inmunizado con DIIIC-2 y oligonucleótido de SEQ ID NO. 1, y al control positivo (p<0,05). Por otro lado, los animales inmunizados con las formulaciones conteniendo los oligonucleótidos 2216, K3 y OriC no alcanzaron niveles de sobrevida con diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo Placebo.

Los restantes cinco animales de cada grupo recibieron 500 DL_{50} del mismo virus, y siete días posteriores a este reto viral todos se sacrificaron, para la extracción del

cerebro, y se cuantificó la carga viral en células VERO. De manera congruente con la sobrevida observada en la Figura 3A, los ratones inmunizados con la formulación DIIIC-2 con el oligonucleótido de SEQ ID NO. 1 presentaron una carga viral baja en cerebro ($<10^2$ ufp/mL), sin diferencias estadísticas respecto al grupo control positivo ($p>0.05$), mientras que los ratones del grupo que recibió la formulación placebo exhibieron una carga viral mayor de 10^4 ufp/mL como valor medio (Figura 3B). Los animales inmunizados con las formulaciones conteniendo los oligonucleótidos 2216, K3 y Ori C exhibieron niveles intermedios de carga viral entre los alcanzados con la formulación del DIIIC-2 y el oligonucleótido de SEQ ID NO. 1, y la formulación placebo, sin diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

EJEMPLO 2. Prueba de concepto en primates no humanos inmunizados con los agregados de la proteína DIIIC-2 y las Partículas Semejantes a Nucleocápsidas obtenidas a partir de la proteína recombinante de la cápsida del VD2.

Basado en los estudios preclínicos en ratones, se procedió a evaluar la proteína DIIIC-2, agregada con el oligonucleótido de SEQ ID NO. 1, y adyuvada en alúmina, en primates no humanos negativos al VD. Adicionalmente, se incluyó un grupo que recibió las PSNs-2 (que contienen el oligonucleótido de SEQ ID NO. 1). A su vez, el grupo placebo recibió una formulación que contenía la cantidad máxima del oligonucleótido de SEQ ID NO. 1, empleado en el proceso de agregación de las proteínas recombinantes, adyuvado en alúmina. En todos los grupos del esquema se incluyeron 3 animales.

La dosis seleccionada fue de 100 µg de proteína y 10 µg de oligonucleótido de SEQ ID NO. 1 para DIIIC-2, y de 50 µg de proteína y 10 µg de oligonucleótido de SEQ ID NO. 1 para las PSNs-2. Los monos recibieron cuatro dosis, por vía subcutánea, espaciadas cada dos meses. Se realizaron sangrados en el momento de cada dosis, y quince días posteriores a las mismas, para medir la respuesta inmune humoral inducida. En la Figura 4 se representa la cinética de aparición de anticuerpos anti-DIIIC-2. Como se puede apreciar, en los monos que recibieron la formulación de DIIIC-2 se comienzan a detectar anticuerpos 15 días después de la administración de la primera dosis. Los títulos aumentaron tras la inoculación de la segunda dosis, a valores mayores que 10 000. Luego de la tercera dosis, los títulos

aumentaron ligeramente, y luego de la cuarta dosis se mantuvieron al mismo nivel (valor medio: 80 000). La respuesta de anticuerpos anti-cápsida en el grupo inmunizado con las PSNs-2, se comportó de forma similar (Figura 4).

La detección de anticuerpos reactivos al VD2 se determinó mediante un ELISA de captura, a través del cual se determinaron los títulos por dilución a punto final de los sueros de estos animales. Los resultados del estudio cinético del desarrollo de anticuerpos antivirales se muestran en la Figura 5. Los anticuerpos antivirales, en los monos que recibieron la formulación de DIIIC-2 con el oligonucleótido de SEQ ID NO. 1, se comenzaron a detectar a los 15 días posteriores a la administración de la segunda dosis (valor medio: 6 000), y cayeron a valores indetectables en el momento de la tercera dosis, es decir, 2 meses después de haber recibido la segunda inoculación del inmunógeno. Seguidamente, tras la administración de la tercera dosis, los títulos aumentaron a valores similares a los obtenidos 15 días tras la segunda dosis; sin embargo en esta ocasión se mantuvieron detectables (valor medio: 800) en el momento de la cuarta dosis, que se corresponde con dos meses después de administrada la tercera dosis. Nuevamente, tras recibir la cuarta inoculación, los animales desarrollaron anticuerpos con valores ligeramente superiores a los detectados en el momento de la administración, y estos se mantuvieron hasta el momento del reto viral con un valor medio de 5 000. Cuando se administró la dosis viral, se pudo detectar un aumento ligero de los títulos de anticuerpos a los 20 y 27 días posteriores al reto, con valores medios de 12 000.

La respuesta de anticuerpos neutralizantes también se midió en este estudio, ya que los mismos constituyen un posible correlato de protección contra este virus. La Tabla 2 refleja los valores obtenidos por cada muestra, en los tiempos señalados, utilizando la línea celular Vero y la cepa de VD2 SB8553.

Como se puede observar, se comienzan a detectar anticuerpos neutralizantes después de la administración de la segunda dosis de DIIIC-2. Quince días después de la tercera inoculación se detectaron títulos mayores, que se mantienen en el momento de la cuarta administración. Luego de 15 días, los títulos aumentaron evidenciándose un claro efecto refuerzo. A su vez, un mes tras la última dosis, en el momento del reto viral, se detectaron los mayores niveles de anticuerpos neutralizantes para todos los animales inmunizados con DIIIC-2. En el caso del grupo que recibió las PSNs-2, según lo esperado, no se detectó respuesta neutralizante en ninguno de los tiempos evaluados antes del reto viral (título

neutralizante menor que 10, resultados no mostrados). El grupo placebo se comportó de forma similar con títulos neutralizantes menores que 10 (resultados no mostrados).

Tabla 2. Desarrollo de anticuerpos neutralizantes contra el VD2 durante el esquema de inmunización en monos con la proteína DIIIC-2 agregada y las PSNs-2.

	Dosis 2 Mes 2	15 días	**Dosis 3** Mes 4	15 días	**Dosis 4** Mes 6	15 días	**Reto** Mes 7
DIIIC-2	<10	150,4	<10	620,5	207,1	888,1	1219,8
	<10	<10	<10	23,6	26,2	79,8	57,7
	<10	13	<10	146,2	146,5	297,7	670,3
TPG	<10	26,9	<10	128,9	92,6	276,3	361,3
Sero conversión	**0%**	**66,7%**	**0%**	**100%**	**100%**	**100%**	**100%**

Un mes tras la última dosis, para el grupo de DIIIC-2, también se determinaron los anticuerpos neutralizantes, empleando tres cepas virales y tres líneas celulares diferentes. En todos los casos se detectó un 100% de seroconversión, indicando la inducción de una respuesta neutralizante robusta (Tabla 3).

Tabla 3. Títulos de anticuerpos neutralizantes inducidos por la proteína DIIIC-2 agregada con el oligonucleótido de SEQ ID NO. 1, en el momento del reto, empleando tres líneas celulares y cepas virales diferentes.

Línea celular	**BHK-21**		**Vero**		**LLC-MK2**
Cepa VD-2	**A15**	**SB8553**	**WHO**	**SB8553**	**SB8553**
DIIIC-2	110	415,2	3861,4	1219,8	1143,8
	55	14,9	169,6	57,7	62,1
	150	156,2	669,7	670,3	216,1
TPG	96,8	98,9	759,8	361,3	248,5
Seroconversión	100 %	100%	100%	100%	100%

Se reflejan los títulos neutralizantes de cada animal por independiente, así como el TPG y el % de seroconversión alcanzado con el sistema experimental empleado.

La respuesta inmune celular fue otro de los parámetros medidos en el presente estudio. Los linfocitos de sangre periférica, aislados en cuatro puntos: día de la cuarta dosis, 15 días tras cuarta dosis, día del reto viral, y 27 días posteriores al reto viral, se estimularon con VD2 infectivo, y se midió la secreción de IFN-γ en el sobrenadante de cultivo. En la Figura 6 se muestran los valores obtenidos en cada punto ensayado. De los tres animales inmunizados con DIIIC-2 y el oligonucleótido de SEQ ID NO. 1, uno (mono 6) indujo secreción de IFN-γ en los tres puntos analizados antes de reto viral. A su vez, posterior a la infección, en el día 27, otro mono de este grupo resultó también positivo, indicando la medición de una respuesta celular anamnéstica.

Por otra parte, de los tres animales que recibieron las PSNs-2, dos de ellos fueron positivos por secreción de IFN-γ en el día de reto viral. A su vez, posterior a la infección, en el día 27, los tres monos de este grupo resultaron positivos, indicando en este caso también la medición de una respuesta celular anamnéstica. Es importante señalar que en ninguno de los animales que recibieron la formulación placebo se detectó secreción de la citocina antiviral ni siquiera tras el reto viral.

Para medir la protección frente al VD2, todos los animales del estudio se retaron con una dosis infectiva del mismo, un mes tras la última dosis. La presencia del virus en sangre se determinó por cuantificación directa en la línea celular VERO. En la Figura 7 se muestran los resultados obtenidos. Los animales que recibieron la formulación placebo desarrollaron viremia durante 3,6 días como valor medio, y con cargas virales medias de 10^2 ufp/mL. Contrariamente, dos de los monos que recibieron la formulación de proteína DIIIC-2 con el oligonucleótido de SEQ ID NO. 1 no desarrollaron viremia y, por consiguiente, se clasifican como totalmente protegidos. En un animal (mono 5), solo se detectó el virus en el día 5, y con un valor muy bajo de carga viral (<10 ufp), lo que también indica un nivel apreciable de protección.

Para el caso del grupo que recibió las PSNs-2, en todos los monos se detectó la presencia de virus, sin embargo la carga viral fue menor comparada con la detectada en el grupo control. De hecho, el mono 9 presentó una carga viral muy baja (<10 ufp), indicando también un nivel apreciable de protección.

En general, se puede afirmar que las proteínas basadas en la cápsida viral, agregadas con el oligonucleótido de SEQ ID NO. 1, inducen una respuesta protectora en monos.

EJEMPLO 3. Obtención y caracterización de las proteínas: DIIIC-1, DIIIC-3 y DIIIC-4.

Se clonó el fragmento génico *BamHI / HindIII* conteniendo el DomIII de la proteína de la envoltura del VD del serotipo 1, 3 y 4 (aminoácidos 286-426) fusionado a la proteína de la cápsida del mismo virus, en el sitio de múltiple clonaje del plasmidio pET28. Este vector de expresión fue previamente modificado, eliminándose la secuencia génica entre el sitio *NcoI* y *BamHI*, a excepción de la cola de histidina, con el fin de eliminar la traducción de aminoácidos no relacionados a la proteína clonada. La construcción genética de los plasmidios se muestra en la Figura 8.

En todos los casos, las proteínas están fusionadas a una cola de histidina en su extremo N-terminal, y se expresan bajo la regulación del promotor T7 lac. Esto permitió, una vez expresadas, desarrollar un proceso de purificación de dichas proteínas, combinando la cromatografía de intercambio iónico y la cromatografía de afinidad a quelatos metálicos. Esta misma metodología se utilizó para la purificación de la proteína DIIIC-2 previamente obtenida. Una vez purificadas las cuatro proteínas recombinantes, se procedió a caracterizar las mismas. Primeramente, se analizó la reactividad de cada una de ellas frente a sueros policlonales provenientes de ratones inmunizados con cada preparación viral, específicamente de líquidos ascíticos hiperinmunes anti-VD de cada serotipo (HMAF, del inglés *hiperimmune ascitic fluid*). Como se muestra en la Figura 9, se obtuvo reactividad por ELISA de cada proteína frente al HMAF del serotipo viral homólogo, indicando una correcta presentación de la región del DomIII en el contexto de la cápsida, ya que la mayoría de los anticuerpos generados contra la proteína de la envoltura viral son conformacionales.

Por otra parte, se estudió el estado del puente disulfuro (S-S) dentro de la región del DomIII, que debe estar presente en cada molécula quimérica. Primeramente, se verificó por espectrometría de masa cada proteína, y se concluyó la correcta formación de dicho puente. Luego, basado en el hecho de que el puente S-S está involucrado directamente en la reactividad del DomIII frente a sueros policlonales anti-VD, se analizó nuevamente la reactividad de cada una de las proteínas

recombinantes frente al HMAF del serotipo homólogo, en condiciones reductoras y no reductoras. Como se observa en la Figura 9, para las proteínas DIIIC-1, 2 y 4 se observa una disminución en la reactividad frente al HMAF homólogo, cuando las proteínas se reducen irreversiblemente mediante alquilación. En el caso de DIIIC-3 también se observa una disminución, aunque menos marcada que en el resto de las proteínas. Estos resultados corroboran la correcta formación del puente S-S y a su vez, su posible papel en la reactividad del DomIII frente a anticuerpos policlonales anti-VD.

EJEMPLO 4. Evaluación inmunológica en ratones de las formulaciones monovalentes DIIIC y tetravalente Tetra DIIIC

Cada proteína quimérica, previamente agregada con el oligonucleótido de SEQ ID NO. 1, así como la mezcla tetravalente de las cuatro moléculas ya agregadas, se evaluaron en ratones BALB/c. Todas las preparaciones se formularon en alúmina como adyuvante base, y se inocularon a los animales en un esquema de tres dosis, administradas cada 15 días por vía intraperitoneal. Como controles positivos, se incluyeron cuatro grupos inmunizados con cada serotipo viral. Como control negativo, un grupo recibió una preparación placebo con la misma cantidad de oligonucleótidos contenida en la formulación tetravalente, y adyuvada en alúmina. Las cantidades de proteína para la formulación tetravalente fueron de 20 µg cada una y 8 µg totales de oligonucleótido de SEQ ID NO. 1. Las formulaciones monovalentes contenían 20 ug de proteína y 2 µg de oligonucleótido de SEQ ID NO. 1.

Después de la tercera dosis, la detección de anticuerpos reactivos a cada virus se determinó mediante un ELISA de captura (Figura 10), a través del cual se determinaron los títulos, por dilución a punto final de los sueros de estos animales. En los animales que recibieron las formulaciones monovalentes se detectaron altos títulos de anticuerpos antivirales en el caso de los serotipos 1, 2 y 3; mientras que los animales inmunizados con DIIIC-4, no desarrollaron títulos contra el serotipo homólogo (VD4). Sin embargo, los animales que recibieron la formulación tetravalente Tetra DIIIC sí desarrollaron anticuerpos contra el VD4, aunque con títulos menores respecto al resto de los serotipos. Este resultado indica que la mezcla de las cuatro proteínas favorece la inducción de anticuerpos contra el VD4, posiblemente por algún nivel de reactividad cruzada con el resto de los serotipos.

Con el objetivo de determinar la funcionalidad de los anticuerpos generados por la inmunización con la formulación tetravalente Tetra DIIIC, se realizó el ensayo de neutralización viral *in vitro* (Tabla 4) contra los serotipos 1, 2, 3 y 4. El ensayo se realizó siguiendo las guías de la Organización Mundial de la Salud, y empleando las cepas de referencia. En los ratones inmunizados con las proteínas DIIIC-1, 2 y 3 se indujeron altos títulos de anticuerpos neutralizantes contra el virus homólogo, comparables a los inducidos con el virus replicativo en los ratones de los grupos controles virales. No se comportó así en el caso de los animales inmunizados con la proteína DIIIC-4, donde en congruencia con los resultados obtenidos en la respuesta antiviral, no se detectaron anticuerpos neutralizantes contra VD4. Sin embargo, la formulación tetravalente, además de inducir anticuerpos neutralizantes contra los serotipos 1, 2 y 3, indujo también anticuerpos funcionales contra el VD4.

Tabla 4. Títulos de anticuerpos neutralizantes en ratones inmunizados con formulaciones monovalentes y tetravalentes de las proteínas quiméricas DIIIC.

	VD a neutralizar			
Grupos	**VD1**	**VD2**	**VD3**	**VD4**
DIIIC-1	>500	-	-	-
DIIIC-2	-	>500	-	-
DIIIC-3	-	-	>500	-
DIIIC-4	-	-	-	<10
Tetra DIIIC	347,1	>1000	>1000	166,34
Control VD1	188,6	-	-	-
Control VD2	-	>500	-	-
Control VD3	-	-	>500	-
Control VD4	-	-	-	>250

En todos los casos se analizó una mezcla de los sueros de los ratones. (-): no determinado.

La respuesta inmune celular fue otro de los parámetros medido en este estudio. Para ello, se extrajeron las células del bazo de los animales inmunizados con la formulación tetravalente Tetra DIIIC, 30 días tras la última dosis y se midió la secreción de IFN-γ, en el sobrenadante de cultivo de los esplenocitos, luego de la estimulación con las cuatro proteínas recombinantes. Como control negativo se emplearon los esplenocitos de los ratones inoculados con la formulación placebo. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 11. Como se aprecia, se detectaron altos niveles de secreción de IFN-γ tras la estimulación con las cuatro proteínas recombinantes, lo cual indica una equivalencia en la respuesta celular obtenida para cada serotipo.

Finalmente, se realizó el ensayo de protección en el modelo de encefalitis viral en ratones. Para este experimento, se seleccionaron los animales inmunizados con la formulación tetravalente Tetra DIIIC, con las formulaciones monovalentes DIIIC-1 y DIIIC-4, los animales controles positivos (inmunizados con VD1 y VD4, respectivamente) y los inmunizados con la formulación placebo. A su vez, los virus de reto a emplear fueron VD1 y VD4, capaces de provocar la muerte de los animales. Como se aprecia en la Figura 12, se obtuvieron altos niveles de protección contra los serotipos 1 y 4, tanto con las formulaciones monovalentes como con la formulación tetravalente, en todos los casos, sin diferencias estadísticas respecto al grupo control viral (p>0,05). Estos resultados indican la capacidad protectora contra los serotipos 1 y 4 de las formulaciones ensayadas, basadas en las proteínas DIIIC agregadas con el oligonucleótido de SEQ ID NO. 1.

EJEMPLO 5. Evaluación inmunológica en primates no humanos de la formulación tetravalente Tetra DIIIC.

La formulación tetravalente Tetra DIIIC ensayada en ratones se evaluó de manera similar en primates no humanos. Se conformaron tres grupos de estudio, de tres animales cada uno, para recibir la formulación tetravalente por tres vías diferentes de administración del antígeno: Grupo 1: subcutánea, Grupo 2: intradérmica y Grupo 3: intramuscular. En los grupos 1 y 3 se administró 50 µg de cada proteína quimérica, previamente agregadas con 5 µg del oligonucleótido de SEQ ID NO. 1, todas mezcladas y adyuvadas en alúmina. En el grupo 2 que recibiría el inmunógeno por vía intradérmica se inoculó 10 veces menos la dosis administrada

por las otras dos vías, o sea 5 µg de cada proteína y 2 µg totales de oligonucleótido de SEQ ID NO. 1, todas mezcladas y adyuvadas en alúmina. Se incluyó además un grupo placebo que recibió la misma cantidad de oligonucleótido de SEQ ID NO. 1 que los grupos 1 y 3, adyuvado en alúmina y administrado por vía intramuscular. Se realizaron sangrados en el momento de cada dosis y un mes posterior a las mismas, para medir la respuesta inmune humoral y celular inducida.

La detección de anticuerpos reactivos a cada serotipo viral se determinó mediante un ELISA de captura, a través del cual se determinaron los títulos por dilución a punto final de los sueros de estos animales. En la Figura 13 se representa la respuesta de anticuerpos antivirales generada en monos tras las tres dosis de la formulación Tetra DIIIC incluyendo el oligonucleótido de SEQ ID NO. 1. Como se puede apreciar, independientemente de la vía de administración del antígeno, en los monos se generó una respuesta de anticuerpos capaces de reconocer a los cuatro serotipos virales en un sistema de ELISA de captura. Además, esta respuesta mostró un patrón de homogeneidad para los cuatro VD, siendo este un resultado importante para el desarrollo de una vacuna contra este patógeno humano, donde se requiere de una respuesta inmune balanceada.

La medición de los anticuerpos neutralizantes se realizó mediante la técnica de neutralización por reducción de número de placas, en células VERO, y empleando las cepas virales VD1 Jamaica, VD2 SB8553, VD3 Nicaragua y VD4 Dominica. Los valores obtenidos tras la tercera inmunización se reflejan en la Tabla 5.

Tabla 5. Títulos de anticuerpos neutralizantes en primates no humanos inmunizados con la formulación tetravalente Tetra DIIIC que incluye el oligonucleótido de SEQ ID NO. 1.

	VD a neutralizar			
Ruta	**VD1**	**VD2**	**VD3**	**VD4**
Subcutánea	77,4	215,9	146,5	46,7
	253,7	186,9	138,3	102
	88,5	192,9	668,1	86,1
TPG	**120,2**	**198,2**	**238,3**	**74,3**
Intradérmica	57,1	153,1	617,8	35,6
	44,6	184,3	165,2	42,5
	49,3	88,6	200	494,2
TPG	**50,1**	**135,7**	**273,3**	**90,8**
Intramuscular	247,2	472,7	254,3	113,1
	47,7	111,4	390,3	121,6
	231,6	215,9	577,5	798,5
TPG	**139,8**	**224,9**	**385,6**	**222,3**

Todos los animales inmunizados con la formulación Tetra DIIIC generaron una respuesta de anticuerpos capaces de neutralizar la infección viral *in vitro*, independientemente de la vía de administración del antígeno. La generación de una respuesta humoral neutralizante, con un 100% de animales respondedores a los cuatro serotipos virales, constituye actualmente una premisa en el desarrollo de una vacuna contra dengue. En el caso del grupo placebo, los títulos neutralizantes fueron inferiores a 20 en todos los animales inmunizados.

La respuesta inmune celular fue otro de los parámetros medidos. Las CMSPs se estimularon con cada una de las proteínas recombinantes DIIIC, y se midió la frecuencia de células productoras de IFN-γ, a través de un ensayo de ELISPOT. En la Figura 14 se muestran los valores obtenidos. Luego de la administración de tres dosis de la formulación tetravalente Tetra DIIIC se generaron en los animales células capaces de secretar la citocina antiviral, ante la estimulación con las proteínas recombinantes, siendo relativamente mayor la respuesta en los animales

inmunizados por vía intramuscular. En todos los grupos ensayados se obtuvo un 100% de animales respondedores a las cuatro proteínas ensayadas.

EJEMPLO 6. Evaluación inmunológica en ratones de la administración combinada de las formulaciones bivalentes y tetravalente de las proteínas DIIIC y oligonucleótido de SEQ ID NO. 1, en régimen de sensibilización-refuerzo.

Con el objetivo de administrar solamente dos dosis de cada formulación de proteína DIIIC, en un mismo esquema de inmunización, se realizó el siguiente diseño experimental:

Grupo Secuencial I dosis 1: Formulación bivalente DIIIC-1/DIIIC-2
dosis 2: Formulación bivalente DIIIC-3/DIIIC-4
dosis 3: Formulación tetravalente Tetra DIIIC

Grupo Secuencial II dosis 1: Formulación bivalente DIIIC-1/DIIIC-3
dosis 2: Formulación bivalente DIIIC-2/DIIIC-4
dosis 3: Formulación tetravalente Tetra DIIIC

Grupo Tetra DIIIC: Todas las dosis de formulación tetravalente Tetra DIIIC

Las proteínas quiméricas DIIIC, previamente agregadas con el oligonucleótido de SEQ ID NO. 1, se mezclaron para formar tanto las formulaciones bivalentes como la formulación tetravalente. El inmunógeno comprendió 20 µg de cada proteína y 4 µg de oligonucleótido de SEQ ID NO. 1 por formulación bivalente. Las cantidades de proteína para la formulación tetravalente fueron de 20 µg cada una y 8 µg totales de oligonucleótido de SEQ ID NO. 1. Todas las variantes se formularon en alúmina como adyuvante base, y se inocularon cada 15 días, por vía intraperitoneal.

El grupo que recibió solamente la formulación tetravalente Tetra DIIIC fungió como control positivo, y el grupo placebo como control negativo.

Después de la tercera dosis, la detección de anticuerpos reactivos a cada virus se determinó mediante un ELISA de captura (Figura 15), a través del cual se determinaron los títulos por dilución a punto final de los sueros de estos animales. Como resultado, se obtuvo que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ensayados, para ninguno de los 4 serotipos virales, lo

cual indica que es posible, a través de administraciones secuenciales de formulaciones bivalentes y un refuerzo con la formulación tetravalente Tetra DIIIC obtener los mismos niveles de inmunogenicidad que administrando tres dosis con la formulación tetravalente.

Adicionalmente, también se midió la respuesta inmune celular. Se extrajeron las células del bazo de los animales inmunizados de cada grupo de ensayo, 30 días tras la última dosis, y se midió la secreción de IFN-γ en el sobrenadante de cultivo de los esplenocitos, luego de la estimulación con las cuatro proteínas recombinantes. Como control negativo se emplearon los esplenocitos de los ratones inoculados con la formulación placebo. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 16. Como se aprecia, se detectaron altos niveles de secreción de IFN-γ tras la estimulación con las cuatro proteínas recombinantes en todos los grupos (excepto en el placebo), lo cual indica una equivalencia en la respuesta celular obtenida, independientemente del régimen de inmunización empleado y de las formulaciones bivalentes administradas en las dos primeras dosis.

REIVINDICACIONES

1. Composición vacunal que se caracteriza porque comprende a) al menos un antígeno que comprende al menos el 50% de la secuencia de la proteína de la cápsida del virus dengue (VD) y b) el oligonucleótido identificado como SEQ ID NO. 1.
2. La composición vacunal de la reivindicación 1 caracterizada porque el antígeno que comprende al menos el 50% de la secuencia de la proteína de la cápsida del VD es un antígeno recombinante que comprende los aminoácidos 1 al 99 de dicha proteína.
3. La composición vacunal de la reivindicación 2 caracterizada porque el antígeno recombinante que comprende los aminoácidos 1 al 99 de la proteína de la cápsida es un antígeno quimérico que se selecciona dentro del grupo compuesto por SEQ ID NO. 5 (antígeno DIIIC-1), SEQ ID NO. 6 (antígeno DIIIC-2), SEQ ID NO. 7 (antígeno DIIIC-3), y SEQ ID No. 8 (antígeno DIIIC-4).
4. La composición vacunal de la reivindicación 1 que se caracteriza porque comprende dos de los antígenos quiméricos que se seleccionan dentro del grupo compuesto por SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7, y SEQ ID No. 8.
5. La composición vacunal de la reivindicación 1 que se caracteriza porque comprende los cuatro antígenos quiméricos identificados como SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7, y SEQ ID No. 8.
6. Ácido nucleico que se caracteriza por la secuencia identificada como SEQ ID NO. 1.
7. Uso del ácido nucleico identificado como SEQ ID NO. 1 para incrementar la respuesta inmune contra un antígeno vacunal que comprende al menos el 50% de la secuencia de la proteína de la cápsida del VD.
8. El uso de la reivindicación 7 donde el antígeno que comprende al menos el 50% de la secuencia de la proteína de la cápsida del VD es un antígeno recombinante que comprende los aminoácidos 1 al 99 de dicha proteína.
9. El uso de la reivindicación 8 donde el antígeno recombinante que comprende los aminoácidos 1 al 99 de la proteína de la cápsida del VD es un antígeno

quimérico que se selecciona dentro del grupo compuesto por SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7, y SEQ ID No. 8.

10. Método de inducir respuesta inmune contra el VD que se caracteriza porque se administra a un sujeto una composición vacunal que comprende a) al menos un antígeno que comprende al menos el 50% de la secuencia de la proteína de la cápsida del VD y b) el oligonucleótido identificado como SEQ ID NO. 1.
11. El método de la reivindicación 10 donde el antígeno que comprende al menos el 50% de la secuencia de la proteína de la cápsida del VD es un antígeno recombinante que comprende los aminoácidos 1 al 99 de dicha proteína.
12. El método de la reivindicación 11 donde el antígeno recombinante que comprende los aminoácidos 1 al 99 de la proteína de la cápsida es un antígeno quimérico que posee una secuencia de aminoácidos que se selecciona dentro del grupo compuesto por SEQ ID NO. 5, la SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7, y SEQ ID No. 8.
13. El método de la reivindicación 12 donde los antígenos quiméricos identificados como SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7 y SEQ ID No. 8 se administran de manera secuencial en composiciones bivalentes.
14. El método de la reivindicación 13 donde adicionalmente se administra una dosis de refuerzo que comprende la composición tetravalente de los cuatro antígenos quiméricos identificados como SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7 y SEQ ID No. 8.
15. El método de la reivindicación 10 donde la composición vacunal que comprende a) al menos un antígeno que comprende al menos el 50% de la secuencia de la proteína de la cápsida del VD y b) el oligonucleótido identificado como SEQ ID NO. 1 se administra por ruta subcutánea, intradérmica o intramuscular.