

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0904020-0 A2**

(22) Data de Depósito: 01/10/2009
(43) Data da Publicação: 14/06/2011
(RPI 2110)



(51) *Int.Cl.:*

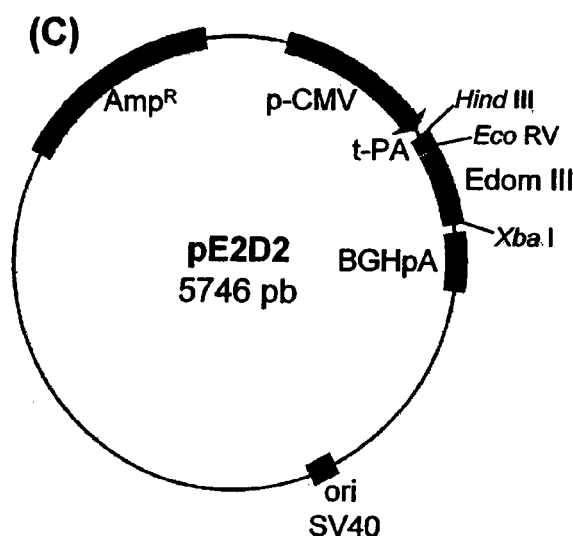
A61K 39/12 2006.01
C12N 7/01 2006.01
C12N 15/40 2006.01
C12N 15/86 2006.01
A61P 31/14 2006.01

(54) Título: **MÉTODO, KIT, PLASMÍDEO E COMPOSIÇÃO PARA INDUZIR RESPOSTA IMUNE CONTRA VÍRUS DA DENGUE BASEADO EM VACINAS DE DNA E VÍRUS QUIMÉRICOS**

(73) Titular(es): Fundação Oswaldo Cruz

(72) Inventor(es): Ada Maria de Barcelos Alves, Adriana de Souza Azevedo, Marcos da Silva Freire, Ricardo Galler

(57) Resumo: MÉTODO, KIT, PLASMÍDEO E COMPOSIÇÃO PARA INDUZIR RESPOSTA IMUNE CONTRA VÍRUS DA DENGUE BASEADO EM VACINAS DE DNA E VÍRUS QUIMÉRICOS. A presente invenção se refere a um método para induzir resposta imune contra vírus da dengue baseado em vacinas de DNA e vírus quiméricos 17D em imunizações combinadas ou co-administradas. Também estão dentro do escopo da presente invenção, vacinas de DNA contra os quatro sorotipos do vírus dengue a partir da construção de diferentes plasmídeos recombinantes contendo o gene que codifica a proteína E, ou somente a sequência que corresponde ao domínio III desta proteína, a partir de cada sorotipo viral do vírus dengue (DENV1-4). A invenção fornece ainda uma composição vacinal consistindo de (a) vacinas de DNA contra os quatro sorotipos do vírus dengue, (b) vírus quiméricos compreendendo o vírus vacinal de febre amarela 17D modificado; e (c) um veículo farmacologicamente aceitável, está incluído no escopo de proteção.





PI0904020-0

MÉTODO, KIT, PLASMÍDEO E COMPOSIÇÃO PARA INDUZIR RESPOSTA IMUNE CONTRA VÍRUS DA DENGUE BASEADO EM VACINAS DE DNA E VÍRUS QUIMÉRICOS

Campo da Invenção

5 A presente invenção se refere a um método para induzir resposta imune contra vírus da dengue baseado em vacinas de DNA e vírus quiméricos 17D em imunizações combinadas ou co-administradas. Também estão dentro do escopo da presente invenção, vacinas de DNA contra os quatro sorotipos do
10 vírus dengue a partir da construção de diferentes plasmídeos recombinantes contendo o gene que codifica a proteína E, ou somente a sequência que corresponde ao domínio III desta proteína, a partir de cada sorotipo viral do vírus dengue (DENV1-4).

15 Está incluída no escopo de proteção uma composição vacinal consistindo de:

(a) vacinas de DNA contra os quatro sorotipos do vírus dengue a partir da construção de diferentes plasmídeos recombinantes contendo os genes das proteínas E a partir de
20 cada sorotipo viral do vírus dengue, ou somente as sequências que correspondem ao domínio III destas proteínas, todas fusionadas à sequência que codifica o peptídeo sinal do ativador de plasminogênio de tecido humano (t-PA);

25 (b) vírus quiméricos compreendendo o vírus vacinal de febre amarela 17D modificado, pela tecnologia de obtenção de clone infeccioso, com a substituição das sequências que codificam as proteínas prM e E de febre amarela pelas sequências que codificam as proteínas prM e E dos vírus

dengue dos diferentes sorotipos; e,

(c) um veículo farmacêuticamente aceitável,

A invenção se relaciona também a um kit compreendendo (a) vacinas de DNA contra os quatro sorotipos do vírus dengue a partir da construção de diferentes plasmídeos recombinantes contendo os genes que codificam as proteínas E a partir de cada sorotipo viral do vírus dengue, ou somente as seqüências que correspondem ao domínio III destas proteínas, todas fusionadas à seqüência que codifica o peptídeo sinal do ativador de plasminogênio de tecido humano (t-PA); e, (b) vírus quiméricos compreendendo o vírus vacinal de febre amarela 17D modificado, pela tecnologia de obtenção de clone infeccioso, com a substituição das seqüências que codificam as proteínas prM e E de febre amarela pelas seqüências que codificam as proteínas prM e E dos vírus dengue dos diferentes sorotipos.

Fundamentos da Invenção

A dengue é considerada um dos principais problemas de saúde pública mundial, entre as doenças causadas por arbovírus, devido a sua importância em termos de morbidade e mortalidade na população humana, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. Seu agente etiológico é o vírus da dengue que é transmitido pelo mosquito do gênero *Aedes*, geralmente *Aedes aegypti*.

O vírus da dengue (DENV) pertence ao gênero Flavivirus, da família Flaviviridae. Há 4 tipos de vírus antigenicamente e sorologicamente distintos: DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4. Apesar da infecção primária pelo vírus da

dengue induzir uma imunidade ao sorotipo infectante, não há uma proteção cruzada de longa duração contra os outros sorotipos virais, ocorrendo infecções sequenciais com os diferentes vírus da dengue.

5 O vírus da dengue é composto por um envelope viral e um nucleocapsídeo complexado a uma molécula de RNA. Seu genoma é de aproximadamente 10.700 nucleotídeos e constitui-se de uma fita simples de RNA com polaridade positiva que codifica a poliproteína precursora das
10 proteínas flavivirais. Este precursor é clivado por proteases celulares e pela protease viral gerando três proteínas estruturais, C (capsídeo), prM (pre-membrana) e E (envelope), e sete proteínas não estruturais, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5. As proteínas estruturais
15 traduzidas são incorporadas nos vírions infecciosos maduros, enquanto as proteínas não estruturais estão envolvidas na replicação e montagem do vírus.

A proteína E (Envelope) do vírus da Dengue é uma proteína estrutural e transmembrana, sendo glicosilada em
20 quase todos Flavivirus. Essa proteína E se destaca como o maior componente glicoprotéico presente na superfície desses vírus, possuindo peso molecular de 55 a 60 kDa, constituída de 493 a 501 aminoácidos.

A proteína E está associada a numerosas atividades
25 biológicas importantes. A proteína E atua como proteína ligante, interagindo com receptores presentes na superfície celular e mediando a fusão da membrana do vírus à membrana da célula hospedeira. Essa proteína também está relacionada à dissociação do nucleocapsídeo e desempenha um importante

papel na virulência do vírus. Além disso, a proteína E é um forte imunógeno, gerando altos níveis de anticorpos em pacientes infectados com o vírus, que podem ser neutralizantes, se ligando a epítópos que interagem com receptores celulares e impedindo, portanto a entrada do vírus nas células do hospedeiro (Chang, 1997; Kinney & Hung, 2001).

A proteína E é formada por um dímero alongado que se estende paralelamente à membrana do vírus. Cada monômero é composto de três domínios: I, II e III. O domínio I é central constituído de 120 resíduos de aminoácidos: 1-51, 133-193, 279-296. O domínio II é alongado, compreende a região onde os dois monômeros estão ligados em vários pontos na molécula, formando o dímero. O domínio II é constituído dos seguintes resíduos de aminoácido: 52-132, 194-280. O domínio III está localizado na porção carboxi-terminal, apresenta-se como uma imunoglobulina, cuja função é se ligar a receptores celulares, como por exemplo, DC-SIGN presente nas células dendríticas imaturas. A ligação vírus/célula mediada pelo domínio III promove a endocitose da partícula viral. O domínio III é constituído dos resíduos de aminoácidos: 298-394. Os epítópos presentes nessa região são capazes de induzir resposta de anticorpos neutralizantes tipo e subtipo-específico.

Diversas vacinas vêm sendo propostas para o combate à dengue, contudo nenhuma das abordagens sugeridas apresentou as características necessárias para uma vacinação em massa, como segurança e uma resposta imune protetora de longo prazo contra os diferentes sorotipos virais circulantes.

Uma das principais dificuldades é construir um protótipo de vacina contendo componentes que induzam uma imunidade protetora contra os quatro sorotipos de vírus da dengue, sem gerar consequências como a febre hemorrágica, e
5 utilizando o menor número possível de doses.

Esforços consideráveis vêm sendo realizados para o desenvolvimento de uma vacina tetravalente atenuada. O mais promissor destes candidatos consiste em vírus atenuados por passagens em cultura de células. Esta vacina está em fase
10 de avaliações clínicas, contudo já foram observadas algumas complicações. Além disso, existe o risco potencial de infecções sérias por vírus que possam surgir de reversões gênicas ou recombinações, tornando difícil formular uma vacina viva atenuada multivalente devido à possibilidade de
15 interferência homóloga ou heteróloga durante a replicação viral (Barrett, 2001; Kinney & Huang, 2001).

Outra estratégia empregada para o desenvolvimento de uma vacina contra o vírus da dengue é a construção de quimeras. Essa tecnologia vem sendo utilizada em diversas
20 pesquisas de vacinas contra Flavivirus, incluindo o vírus da Dengue (Galler et al., 2005).

Apesar dos avanços obtidos até o momento, existe ainda um grande desafio: produzir uma vacina capaz de gerar uma resposta homogênea contra os quatro sorotipos do vírus da
25 Dengue.

A vacina de DNA representa uma eficiente tecnologia no desenvolvimento de vacinas para o controle de agentes infecciosos. Esta técnica compreende a inoculação de um plasmídeo de expressão eucariótico contendo o antígeno de

interesse, que é sintetizado *in vivo* pelas células do organismo inoculado e é apresentado pelos complexos de histocompatibilidade I e II (MHC I e II), ativando uma imunidade específica. A expressão endógena do antígeno
5 pelas células hospedeiras parece simular uma infecção viral natural sendo capaz de gerar tanto uma resposta imune humoral, com produção de anticorpos, como uma resposta celular, com indução de linfócitos T citotóxicos. A indução destas duas formas de resposta imune fornece vantagens em
10 comparação com as vacinas de subunidades, que produzem principalmente, ou exclusivamente, uma resposta de anticorpos, e se compara à resposta celular de vacinas vivas atenuadas, sem apresentar o risco de reversão para forma patogênica do agente infeccioso. Além disso, as
15 vacinas de DNA são estáveis a variações de temperatura, de menor custo para a produção em grande escala, e permitem uma rápida seleção de seqüências a serem avaliadas.

Recentemente, vários grupos têm analisado o uso da vacina de DNA no controle de flavivírus. Alguns destes
20 estudos com diferentes vírus desta família têm demonstrado a indução de uma resposta imune protetora flavivírus-específica em camundongos e primatas não humanos após a vacinação com plasmídeos codificando as proteínas flavivirais prM e E (Phillpotts et al., 1996; Kochel et
25 al., 1997;; Raviprakash et al, 2000). Algumas análises também foram realizadas utilizando vacinas de DNA contendo os genes de proteínas não estruturais de flavivírus como: o vírus da encefalite japonesa, hepatite C e dengue (Lin et al., 1998; Encke et al., 1998; Wu et al., 2003; Costa et

al., 2006, 2007).

Estudos recentes demonstraram que vacinas DNA contendo a sequência completa dos genes que codificam as proteínas prM e E, e a região do domínio III do vírus DENV1-4, foram capazes de induzir uma resposta imune humoral com a presença de anticorpos contra Dengue em modelos murinos.

5 Entretanto nestes estudos o potencial protetor das vacinas de DNA foi avaliado somente indiretamente (soroneutralização e resposta celular) não sendo realizados testes de desafios diretos com doses letais do vírus da Dengue para avaliar eficácia dessas vacinas (Chen et al., 2007). Algumas vacinas de DNA contra dengue foram testadas em primatas não humanos (*Aotus* e *Rhesus*) e conferiram proteção parcial, avaliada
10 através da viremia nos animais desafiados com o vírus da Dengue (Raviprakash et al., 2000; Putnak et al., 2003; Blair et al., 2006).

No que se refere ao método de imunização, os presentes inventores destacam que Putnak e colaboradores (2003),
15 construíram uma vacina DNA contendo os genes que codificam as proteínas prM e E a partir do DENV2, observaram a imunogenicidade desta em camundongos e imunizaram em seguida macacos Rhesus. Entretanto, foram necessárias várias doses da vacina para a indução de uma resposta
20 protetora e de curta duração. Sete meses após as imunizações, os animais não se mostraram mais protegidos contra desafios com o vírus da dengue. Assim, podemos observar que estes estudos indicam a necessidade da utilização de novas estratégias para aumentar a duração da
25 resposta imune. Mais recentemente tem sido demonstrado que a combinação de vacinas de DNA com outras vacinas pode gerar respostas imunes mais eficientes do que as mesmas abordagens isoladamente.

O pedido de patente WO2008/127307, publicado em 23/10/2008, está direcionado para um método de indução de resposta imune contra o vírus da dengue usando uma metodologia de vacinação de dose/reforço. Mais especificamente, o documento WO2008/127307 está direcionado à administração de uma dose de um imunógeno do vírus da dengue que compreende uma vacina de DNA ou uma vacina tetravalente de DNA ou uma vacina tetravalente inativada purificada e uma dose reforço de um imunógeno do vírus da dengue, compreendendo uma vacina viral tetravalente de vírus atenuado. Entretanto, esta estratégia apresenta as dificuldades inerentes à utilização de uma vacina tetravalente de vírus dengue atenuado, como por exemplo a possibilidade de interferência de um ou mais vírus na replicação *in vivo* dos outros vírus, levando consequentemente a respostas imunes heterogêneas em relação aos diferentes sorotipos virais. Além disso, o documento também está direcionado à utilização de adenovírus contendo genes que codificam proteínas de dengue como reforço para uma vacina tetravalente, o que pode implicar em uma baixa eficiência na indução de respostas imunes contra dengue em seres humanos. Tal fato se deve à presença, em seres humanos, de respostas imunes prévias contra adenovírus, que podem impedir a infecção com adenovírus vetor carreando genes do vírus da dengue, e consequentemente comprometendo a eficiência da resposta imune ao vírus da dengue.

Também é conhecido o pedido de patente US20080193477, publicado em 14/08/2008, um método que emprega um regime de imunização compreendendo a administração de uma primeira

vacina de febre amarela seguida da administração de uma vacina de dengue a base de flavivirus quimérico. Entretanto, outros relatos na literatura demonstraram que a imunização com o vírus vacinal da febre amarela pode comprometer a eficiência da resposta imune gerada posteriormente com vírus quiméricos de febre amarela contendo genes do vírus da dengue. Neste caso os níveis de anticorpos neutralizantes contra o vírus da dengue foram significativamente menores em macacos previamente vacinados contra febre amarela (Galler et al., 2005). Como aqui discutido, verificamos que apesar dos esforços que vem sendo desenvolvidos, há ainda uma necessidade para o desenvolvimento de vacinas de DNA mais eficazes e capazes de induzir um aumento da resposta imune, assim como a utilização de estratégias vacinais combinadas que incrementem esta resposta imune.

Sumário da Invenção

O objetivo da presente invenção é propiciar um método para induzir resposta imune contra vírus da dengue baseado em vacinas de DNA e vírus quiméricos 17D em imunizações combinadas ou co-administradas.

Também é um objetivo da invenção fornecer uma composição de vacinas de DNA contra os quatro sorotipos do vírus dengue a partir da construção de diferentes plasmídeos recombinantes contendo os genes que codificam as proteínas E a partir de cada sorotipo viral do vírus dengue (DENV1-4), ou somente as seqüências que correspondem ao domínio III destas proteínas, todas fusionadas à seqüência que codifica o peptídeo sinal do t-PA.

Uma composição vacinal consistindo de (a) vacinas de DNA contra os quatro sorotipos do vírus dengue a partir da construção de diferentes plasmídeos recombinantes contendo os genes que codificam as proteínas E a partir de cada sorotipo viral do vírus dengue, ou somente as seqüências que correspondem ao domínio III destas proteínas, todas fusionadas à seqüência que codifica o peptídeo sinal do t-PA; e, (b) vírus quiméricos compreendendo o vírus vacinal de febre amarela 17D modificado, cujas seqüências que codificam as proteínas prM e E de febre amarela foram substituídas pelas seqüências que codificam as proteínas prM e E dos vírus dengue dos diferentes sorotipos, e um veículo farmacêuticamente aceitável, está incluída no objetivo da presente invenção.

A invenção apresenta ainda um kit compreendendo (a) vacinas de DNA contra os quatro sorotipos do vírus dengue a partir da construção de diferentes plasmídeos recombinantes contendo os genes das proteínas E, ou somente as seqüências que correspondem ao domínio III destas proteínas a partir de cada sorotipo viral do vírus dengue; e, (b) vírus quiméricos compreendendo o vírus vacinal de febre amarela 17D modificado, cujas seqüências que codificam as proteínas prM e E de febre amarela foram substituídas pelas seqüências que codificam as proteínas prM e E dos vírus dengue dos diferentes sorotipos.

Breve Descrição da Figuras

A Figura 1 é uma representação esquemática dos plasmídeos pcTPA, pE1D2 e pE2D2.

A Figura 2 mostra a imunofluorescência de células BHK-

21 transfectadas com os plasmídeos pE1D2 (A e A'), pE2D2 (B e B') e pCTPA (C e C'), onde o contraste de fase é mostrado em A, B e C; a fluorescência é mostrado em A', B' e C' (aumento de 1000x A e B, 400x C).

5 As Figuras 3A-3B mostram os resultados do primeiro experimento com pE1D2.

As Figuras 3C-3D mostram os resultados do segundo experimento com pE1D2.

10 As Figuras 4A-4B mostram os resultados do primeiro experimento com pE2D2.

As Figuras 4C-4D mostram os resultados do segundo experimento com pE2D2.

15 As Figuras 5A-5D mostram os resultados do terceiro experimento com combinações simultâneas com pE1D2, pE2D2, 17D-D2.

Descrição Detalhada da Invenção

Os presentes inventores encontraram no estado da arte que a proteína do envelope (E) do vírus da dengue é um forte imunógeno, podendo gerar uma resposta protetora com
20 altos níveis de anticorpos neutralizantes. Sendo assim, o primeiro objetivo da presente invenção é construir vacinas de DNA contra dengue contendo os genes que codificam as proteínas E, sem a região hidrofóbica C-terminal, ou contendo as seqüências dos domínios III destas proteínas,
25 inseridos no plasmídeo pCTPA, que possui a seqüência sinal do ativador de plasminogênio de tecido humano (t-PA), um eficiente peptídeo sinal já testado em outras vacinas. A presente invenção também tem como objetivo estabelecer um método para induzir resposta imune protetora contra os

vírus da dengue, baseada na administração de vacinas de DNA e vírus quiméricos 17D em imunizações combinadas no sistema de dose/reforço ou co-administração das duas vacinas.

O plasmídeo pcTPA contém uma sequência de DNA
5 correspondente ao peptídeo sinal do gene do ativador de plasminogênio de tecido humano (t-PA). Existem diferenças no tamanho da região do t-PA identificada como peptídeo sinal. O artigo que descreve a clonagem e o sequenciamento do gene do t-PA (Pennica et al., Nature, 301:214-221, 1983)
10 identifica uma região de 105 pares de bases, que codifica os primeiros 35 aminoácidos, como peptídeo sinal. O plasmídeo pcTPA contém uma sequência de 69 pares de bases que corresponde aos primeiros 23 aminoácidos SEQ ID NO:8. A sequência correspondente ao peptídeo sinal do t-PA foi
15 clonada no plasmídeo pcDNA3 (Invitrogen) utilizando os sítios das enzimas de restrição *HindIII* e *EcoRV*. Deste modo, qualquer sequência pode ser clonada a jusante ao sítio *EcoRV*, utilizando o sítio desta enzima que gera fragmentos de ponta cega, podendo, portanto, se ligar a
20 outro fragmento também de ponta cega, sem necessariamente ter sido digerido com *EcoRV*. Além deste sítio, o plasmídeo pcTPA conserva os cinco sítios de enzimas de restrição a jusante ao da *EcoRV* (*BstXI*, *NotI*, *XhoI*, *XbaI* e *ApaI*), oriundos do sítio múltiplo de clonagem do plasmídeo pcDNA3,
25 que também podem ser utilizados para clonagens de novas sequências.

Para a construção dos diferentes plasmídeos recombinantes, contendo a sequência que codifica a proteína E sem a sua porção hidrofóbica C-terminal (E80%) - SEQ ID

NO:6 -, ou somente a sequência que corresponde ao domínio
III - SEQ ID NO:7 - desta proteína, foi utilizada a
linhagem de DENV2 Nova Guiné C (NGC) (M29095; gi:323447).
Esse vírus foi obtido a partir de cultura de células Vero
5 infectadas. Os fragmentos do gene E clonados no plasmídeo
pCTPA foram amplificados por PCR a partir do RNA total de
células vero infectadas com DENV2 NGC. O RNA serviu como
molde para a síntese de um cDNA contendo as regiões alvo,
utilizando oligonucleotídeos específicos. Este cDNA serviu
10 então como molde para a amplificação por PCR das sequências
alvo, utilizando outros oligonucleotídeos contendo sítios
de enzimas de restrições que foram usadas nas clonagens. Os
fragmentos amplificados foram resolvidos em gel de agarose
e em seguida retirados e purificados com resinas (gene
15 clean). Os fragmentos obtidos, assim como o plasmídeo
pCTPA, foram digeridos com enzimas de restrições
específicas e ligados com T4 DNA ligase. Os clones
recombinantes foram obtidos em *Escherichia coli*, cepa DH5-
 α , transformada com estes plasmídeos, confirmados por
20 digestões com enzimas de restrição e posteriormente por
sequenciamento.

Para avaliar a capacidade dos plasmídeos
recombinantes, obtidos conforme descrito acima, de mediar
a expressão das proteínas E, sem a região hidrofóbica na
25 porção C-terminal (E80%) ou somente o seu domínio III (dom
III), foram realizados ensaios de análise da expressão *in*
vitro destas proteínas utilizando células BHK-21
transfectadas com os diferentes plasmídeos. Os plasmídeos
recombinantes foram obtidos a partir do plasmídeo pCTPA,

que foi construído a partir do plasmídeo pcDNA3 (Invitrogen). Esse vetor promove a expressão das proteínas recombinantes sob o controle do promotor do citomegalovírus humano (CMV) e contém a sequência que codifica o peptídeo
5 sinal do ativador de plasminogênio de tecido humano (t-PA), que direciona estas proteínas para o meio extracelular.

Para avaliar a produção das proteínas de interesse, culturas de células BHK-21 foram transfectadas com os plasmídeos recombinantes, utilizando lipofectamina, de
10 acordo com as instruções do fabricante. A expressão das proteínas recombinantes foi analisada por imunofluorescência, conforme descrito em Costa SM et al., 2006. Para a produção em grande escala dos plasmídeos recombinantes e controle, foram utilizadas bactérias *E.*
15 *coli*, cepa DH5- α , transformadas com os diferentes plasmídeos e cultivadas em meio TB líquido, durante a noite a 37°C. Os plasmídeos foram purificados em colunas de troca iônica, utilizando o kit QIAGEN tip 10.000 conforme recomendação do fabricante, e ressuspensos em água,
20 quantificados em espectrofotômetro e gel de agarose. As vacinas de DNA foram armazenadas a -20°C até sua utilização.

As vacinas de DNA da presente invenção foram testadas isoladamente quanto à sua capacidade protetora. Esses
25 testes tiveram por finalidade analisar a eficiência da expressão das proteínas recombinantes *in vitro*, avaliar a resposta de anticorpos gerada em camundongos e realizar ensaios de desafios com inoculações intracerebrais de doses letais do vírus. Os testes de soroneutralização também

foram realizados com células Vero e com os vírus citados anteriormente, conforme descrito por Cafour et al., 2001.

Para a avaliação das construções obtidas, grupos de camundongos BALB/c machos com cerca de quatro semanas de

5 idade foram imunizados com os plasmídeos recombinantes e controle. Os camundongos foram inoculados por via intramuscular (im) nos quadríceps posteriores com estes plasmídeos diluídos em PBS. Em cada inoculação foram

10 injetados 100µg de DNA por animal (50µg por pata). Na nova abordagem de imunização da presente invenção, ou seja, o sistema de dose (vacina de DNA) e reforço (vírus quimérico) ou imunizações simultâneas (co-administração), as vacinas de DNA da presente invenção foram testadas em imunizações

15 combinadas com vírus quimérico (17D-D2). Esta quimera foi construída a partir do vírus vacinal da febre amarela YF 17D, com a substituição dos genes que codificam as proteínas prM e E deste vírus pelos genes prM e E de DENV2, cepa NGC, SEQ ID NO:9. Vale ressaltar que os testes dessa

20 nova abordagem de imunização foram iniciados com a construção das vacinas de DNA de DENV2 e a realização de um teste de desafio que demonstrou a capacidade protetora destas vacinas, principalmente quando se utilizou a sequência que codifica o gene E sem a sua porção hidrofóbica C-terminal.

25 Para a construção da quimera 17D-D2, foi utilizada a abordagem do cDNA infeccioso de febre amarela, desenvolvido por Rice et al., 1989, que consiste em dois plasmídeos: pYF5'3'IV e pYFM5.2. Nesta abordagem o genoma do vírus de febre amarela foi separado nos dois plasmídeos citados

anteriormente, dada a falta de estabilidade de algumas sequências virais em plasmídeos de alto número de cópias. Estes plasmídeos foram digeridos com enzimas de restrições específicas e os fragmentos gerados foram ligados, reconstituindo o genoma completo do vírus vacinal de febre amarela. Entretanto, testes em macacos com este vírus indicaram a necessidade de modificações genéticas do cDNA para tornar o vírus mais atenuado (Marchevsky et al., 1995). Tais modificações foram realizadas por Galler e Freire, (US 6.171.854) e resultaram em novas versões dos plasmídeos pYF5'3'IV e pYFM5.2, denominados G1/2 e T3/27, respectivamente. Posteriormente, foi utilizado o plasmídeo pACNR1180 (Ruggli et al., 1996) que possui uma origem de replicação (P15A), que limita o número de replicações deste plasmídeo, reduzindo assim o número de cópias do DNA plasmidial em bactérias. O plasmídeo pACNR1180 foi descrito como um plasmídeo ideal para clonagem do genoma do vírus de febre suína, cujo tamanho se assemelha ao do genoma do vírus da febre amarela, permitindo a estabilidade do genoma clonado. Tendo em vista estes resultados, o genoma inteiro do vírus de febre amarela foi clonado em um plasmídeo modificado do pACNR1180 (com a retirada de alguns sítios de enzimas de restrição), gerando o plasmídeo pYF17D/14. O plasmídeo pYF17D/14 foi gerado em duas etapas. Primeiro o plasmídeo G1/2 foi utilizado como molde para amplificação por PCR de diferentes fragmentos que foram inseridos no plasmídeo modificado do pACNR1180, gerando o plasmídeo NSK7. Posteriormente, o plasmídeo NSK7 foi utilizado para a clonagem do restante do genoma do vírus vacinal 17D contido

no plasmídeo T3/27, gerando então o plasmídeo pYF17D/14. Todos os plasmídeos foram propagados em *E. coli* MC1061 e purificados em coluna Qiagen. Para a construção da quimera 17D-D2 foi utilizado o vírus DENV2 cepa Nova Guiné. Foi sintetizado um cDNA, de modo semelhante ao descrito anteriormente para as clonagens nas vacinas de DNA, que continha a região do genoma do vírus da dengue que vai do primeiro nucleotídeo correspondente ao gene que codifica a proteína prM até a sequência correspondente ao aminoácido 205 da proteína E. Esta região foi amplificada por PCR e inserida no plasmídeo G1/2 entre os sítios para as enzimas de restrição *ApaI* e *NotI*, gerando o plasmídeo pG1/2 DEN2. O cDNA contendo o genoma completo 17D-D2 foi construído a partir da ligação dos fragmentos: *NotI/NsiI* gerado com digestão do plasmídeo pG1/2 DEN2 (com o promotor SP6, a região 5' NTR-C de febre amarela e prM-2/3E de DENV2), *NsiI/MluI* gerado com a digestão do plasmídeo pYFD/F11/12 (codificando a região 3' de E de DENV1 e o início do gene NS1 de febre amarela), e *MluI/NotI* gerado com a digestão do plasmídeo pYF17D/14 (que contém o restante do genoma de febre amarela). Todos os plasmídeos foram propagados em *E. coli* XL-1 Blue e purificados com Concert High Purity System (Invitrogen). O plasmídeo completo foi linearizado com *XhoI* e utilizado para a transcrição *in vitro*, através da região promotora SP6. O RNA sintetizado *in vitro* foi utilizado para a regeneração viral por eletroporação de células Vero de modo similar ao descrito no documento US 6,171,854.

Além das inoculações com as vacinas de DNA isoladas, foi analisada também a resposta imune gerada em camundongos

tratados com imunizações combinadas: sistema de dose (vacina de DNA) e reforço (vírus quimérico 17D-D2), e imunizações simultâneas (co-administração) dos dois tipos de vacinas. No sistema de dose/reforço, camundongos BALB/c receberam duas doses das vacinas de DNA de DENV2, como descrito acima, e, duas semanas após a última dose, foram inoculados por via subcutânea (sc) ou intramuscular (im) com 4 log₁₀ PFU de vírus quimérico (17D-D2). Nas imunizações simultâneas (co-administração) as duas vacinas (DNA e quimera 17D-D2) foram misturadas em solução salina tamponada (PBS) e inoculadas por via im, em duas doses com intervalo de duas semanas.

A resposta imune gerada com as vacinas de DNA isoladamente ou em conjunto com vírus quimérico foi avaliada pela produção de anticorpos neutralizantes.

Os animais foram sangrados por via retro-orbital duas semanas após a segunda dose de DNA ou duas semanas após a última imunização, e ao final dos testes de desafio com DENV2. O soro pré-imune foi obtido no dia anterior ao início das imunizações. Nos ensaios de neutralização, os vírus DENV foram incubados com diferentes diluições dos soros dos camundongos imunizados e posteriormente foi avaliada a capacidade destes vírus infectar células Vero, através da formação das placas de lise. A partir dessas análises é possível titular os níveis de anticorpos neutralizantes.

Os camundongos BALB/c imunizados com os diferentes plasmídeos isoladamente ou em combinação com o vírus 17D-D2 foram desafiados por inoculação intracerebral de DENV2

(aproximadamente 4.3 log₁₀ PFU, que corresponde a uma LD₅₀ de 3,8), 25 dias após a última dose de DNA ou 10 dias após a inoculação com o vírus quimérico. Antes do desafio os animais foram anestesiados com uma mistura de ketamine-
5 xylazine. A titulação do vírus foi feita em células Vero logo após a sua inoculação nos animais, como descrito por Caufour et al., 2001. Os camundongos foram avaliados diariamente até 21 dias após o desafio quanto à morbidade, principalmente o desenvolvimento de paralisia nos membros
10 posteriores, e mortalidade. Os animais moribundos foram sacrificados, assim como os que sobreviveram 21 dias após o desafio. O sangue destes camundongos foi coletado, para os testes de soroneutralização.

A invenção será, agora, descrita através de exemplos.
15 Os exemplos seguintes são ilustrativos da invenção e representam as modalidades preferidas, aqueles habilitados no estado da arte sabem ou são capazes de encontrar, usando nada mais que experimentação rotineira, como empregar outros materiais e técnicas apropriadas.

20 **Exemplo 1 - Construção do vetor de expressão pCTPA:**

Um novo plasmídeo de expressão foi construído inserindo a sequência que codifica o peptídeo sinal do do ativador de plasminogênio de tecido humano (t-PA) - SEQ ID NO:8 no plasmídeo original pcDNA3 (Invitrogen). O fragmento
25 equivalente a esta sequência foi amplificado por PCR, utilizando iniciadores específicos (Figura 1).

Abaixo apresentamos os oligonucleotídeos usados para a reação de amplificação por PCR. Os sítios de restrição *Hind* III e *EcoRV* estão sublinhados, respectivamente.

SEQ ID NO:1 - Oligonucleotídeo senso (TPA1)

5' GGGGAAGCTTATGGATGCAATGAAGAGG3'

SEQ ID NO:2 - Oligonucleotídeo antisenso (TPA2)

5' GGGGATATCGCTGGGCGAAACGAAGAC3'

5 O produto de PCR, contendo 69 pb, foi digerido e clonado no plasmídeo pcDNA3 entre os sítios das enzimas *HindIII* e *EcoRV*. A sequência foi confirmada por sequenciamento e o plasmídeo recombinante denominado de pcTPA (Figura 1A).

10 **Exemplo 2 - Construção de pE1D2 e pE2D2**

Foram construídos dois plasmídeos (pE1D2 e pE2D2) a partir do plasmídeo pcTPA. O plasmídeo pcTPA é derivado do plasmídeo pcDNA3 (Invitrogen) com a adição da sequência que codifica o peptídeo sinal do ativador de plasminogênio de tecido humano (t-PA), entre os sítios das enzimas de restrição (*HindIII* e *EcoRV*, a jusante à região promotora derivada do citomegalovírus humano, contido no plasmídeo pcDNA3).

O plasmídeo pE1D2 foi construído com a inserção da sequência que codifica 80% da proteína do envelope viral (E) do vírus da dengue, sorotipo 2 (DENV2), sem a porção C-terminal da proteína E. Esta sequência, contida entre os nucleotídeos 937 e 2131 do genoma completo do DENV2, cepa Nova Guiné C (NGC) (Genbank: M29095) foi amplificada por PCR, utilizando os oligonucleotídeos senso e antisenso, identificados abaixo como SEQ ID NO:3 e SEQ ID NO:4, com os sítios para as enzimas de restrição *EcoRV* e *XbaI* sublinhados, respectivamente:

SEQ ID NO:3 - 5' GGGGGATATCATGCGTTGCATAGGAATATC3'

SEQ ID NO:4 - 5'GGGGTCTAGATTACGATAGAACTTCCTTTC3'

Em seguida foi feita a clonagem da sequência no plasmídeo pcTPA entre os sítios das enzimas de restrição *EcoRV* e *XbaI*, no mesmo quadro aberto de leitura da
5 sequência que codifica o peptídeo sinal t-PA, gerando o plasmídeo pE1D2 conforme figura 1B.

O plasmídeo pE2D2 foi construído com a inserção da sequência que codifica o domínio III da proteína E de DENV2, contida entre os nucleotídeos 1822 e 2131 do genoma
10 completo de DENV2, cepa NGC (Genebank: M29095). Esta sequência foi amplificada por PCR, utilizando os oligonucleotídeos senso e antisenso, identificados abaixo como SEQ ID NO:5 e SEQ ID NO:6, com os sítos para as enzimas de restrição *EcoRV* e *XbaI* sublinhados,
15 respectivamente:

SEQ ID NO:5 - 5'GGGGGATATCGGAATGTCATACTCTATG3'

SEQ ID NO:4 - 5'GGGGTCTAGATTACGATAGAACTTCCTTTC3'

Em seguida foi feita a clonagem da sequência no plasmídeo pcTPA entre os sítios das enzimas de restrição
20 *EcoRV* e *XbaI*, no mesmo quadro aberto de leitura da sequência que codifica o peptídeo sinal t-PA, gerando o plasmídeo pE2D2 conforme figura 1C.

Todas as clonagens foram confirmadas por sequenciamento. A bactéria *Escherichia coli*, cepa DH5- α ,
25 foi utilizada para as clonagens e produção dos plasmídeos em pequena e grande escala.

Os plasmídeos foram isolados pelo método de extração alcalina, purificados em coluna de troca iônica (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante, ressuspensos em

água miliQ estéril e estocados a -20°C até a sua utilização.

Exemplo 3 - Vírus quimérico 17D-D2

O vírus quimérico 17D-D2 foi construído trocando-se os genes que codificam as proteínas de membrana (prM) e do envelope (E) do vírus vacinal da febre amarela YF 17DD pelos genes que codificam as proteínas prM e E de DENV2, cepa NGC. Detalhes da construção do vírus quimérico 17D-D2 podem ser encontrados em Cafour et al., 2001.

Para a construção da quimera 17D-D2, foi utilizada a abordagem do cDNA infeccioso de febre amarela, desenvolvido por Rice et al., 1989, que consiste em dois plasmídeos: pYF5'3'IV e pYFM5.2. Nesta abordagem o genoma do vírus de febre amarela foi separado nos dois plasmídeos citados anteriormente, dada a falta de estabilidade de algumas sequências virais em plasmídeos de alto número de cópias. Estes plasmídeos foram digeridos com enzimas de restrições específicas e os fragmentos gerados foram ligados, reconstituindo o genoma completo do vírus vacinal de febre amarela. Entretanto, testes em macacos com este vírus indicaram a necessidade de modificações genéticas do cDNA para tornar o vírus mais atenuado (Marchevsky et al., 1995). Tais modificações foram realizadas por Galler e Freire (US 6,171,854) e resultaram em novas versões dos plasmídeos pYF5'3'IV e pYFM5.2, denominados G1/2 e T3/27, respectivamente. Posteriormente, foi utilizado o plasmídeo pACNR1180 (Ruggli et al., 1996) que possui uma origem de replicação (P15A), que limita o número de replicações deste plasmídeo, reduzindo assim o número de cópias do DNA

plasmidial em bactérias. O plasmídeo pACNR1180 foi descrito como um plasmídeo ideal para clonagem do genoma do vírus de febre suína, cujo tamanho se assemelha ao do genoma do vírus da febre amarela, permitindo a estabilidade do genoma clonado. Tendo em vista estes resultados, o genoma inteiro do vírus de febre amarela foi clonado em um plasmídeo modificado do pACNR1180 (com a retirada de alguns sítios de enzimas de restrição), gerando o plasmídeo pYF17D/14. O plasmídeo pYF17D/14 foi gerado em duas etapas. Primeiro o plasmídeo G1/2 foi utilizado como molde para amplificação por PCR de diferentes fragmentos que foram inseridos no plasmídeo modificado do pACNR1180, gerando o plasmídeo NSK7. Posteriormente, o plasmídeo NSK7 foi utilizado para a clonagem do restante do genoma do vírus vacinal 17D contido no plasmídeo T3/27, gerando então o plasmídeo pYF17D/14. Todos os plasmídeos foram propagados em *E. coli* MC1061 e purificados em coluna Qiagen. Para a construção da quimera 17D-D2 foi utilizado o vírus DENV2 cepa Nova Guiné. Foi sintetizado um cDNA, de modo semelhante ao descrito anteriormente para as clonagens nas vacinas de DNA, que continha a região do genoma do vírus da dengue que vai do primeiro nucleotídeo correspondente ao gene que codifica a proteína prM até a sequência correspondente ao aminoácido 205 da proteína E. Esta região foi amplificada por PCR e inserida no plasmídeo G1/2 entre os sítios para as enzimas de restrição *ApaI* e *NotI*, gerando o plasmídeo pG1/2 DEN2. O cDNA contendo o genoma completo 17D-D2 foi construído a partir da ligação dos fragmentos: *NotI/NsiI* gerado com digestão do plasmídeo pG1/2 DEN2 (com o promotor SP6, a

região 5' NTR-C de febre amarela e prM-2/3E de DENV2),
NsiI/MluI gerado com a digestão do plasmídeo pYFD/F11/12
 (codificando a região 3' de E de DENV1 e o início do gene
 NS1 de febre amarela), e *MluI/NotI* gerado com a digestão
 5 do plasmídeo pYF17D/14 (que contém o restante do genoma de
 febre amarela). Todos os plasmídeos foram propagados em *E.*
coli XL-1 Blue e purificados com Concert High Purity System
 (Invitrogen). O plasmídeo completo foi linearizado com *XhoI*
 e utilizado para a transcrição *in vitro*, através da região
 10 promotora SP6. O RNA sintetizado *in vitro* foi utilizado
 para a regeneração viral por eletroporação de células Vero
 de modo similar ao descrito no documento US 6,171,854.

Exemplo 4 - Avaliação da expressão das proteínas recombinantes

15 A expressão das proteínas recombinantes foi avaliada
in vitro em células de rim de hamster neonatos (BHK-21)
 transfectadas com os diferentes plasmídeos, utilizando
 lipofectamina (Invitrogen) de acordo com as instruções do
 fabricante. A expressão das proteínas E1 e E2 foi detectada
 20 por imunofluorescência nas células BHK transfectadas e
 observadas em microscópio óptico de fluorescência
 utilizando fluido ascítico anti-DENV2 (ATCC) e anticorpos
 anti-IgG de camundongo conjugados a fluoresceína (Southern
 Biotechnology). Somente as células transfectadas com os
 25 plasmídeos com os plasmídeos pE1D2 e pE2D2 se mostraram
 fluorescentes, demonstrando que estas construções são
 capazes de mediar a expressão das proteínas do vírus da
 dengue em células de mamíferos, conforme Figura 2.

Exemplo 5 - Imunizações

Foram realizados dois experimentos independentes para testar o potencial protetor das vacinas de DNA isoladamente ou em conjunto com o vírus quimérico 17D-D2 no sistema de dose/reforço, utilizando camundongos BALB/c com cerca de 4
5 semanas de idade.

Para as imunizações com as vacinas de DNA, os plasmídeos foram diluídos em PBS (concentração final 1x) e os animais foram inoculados por via intramuscular (im) nos quadríceps posteriores com 100µg/100µL da vacina de DNA
10 por animal (50µg/50µL por pata). Para as imunizações com o vírus quimérico 17D-D2, os animais foram inoculados por via subcutânea (sc) no coxim plantar ou intramuscular (im) nos quadríceps posteriores, com 4 log 10 PFU de vírus diluído em meio M199 (Sigma) ou em PBS. O plasmídeo pcTPA foi
15 utilizado como controle negativo.

Foi realizado um terceiro experimento com imunizações simultâneas (co-administração) de vacinas de DNA e 17D-D2 por via im. Neste caso, as duas vacinas foram misturadas em uma só solução com PBS.

20 Os animais foram separados em grupos (10 camundongos por grupo). Em seguida os animais foram imunizados a cada duas semanas e duas semanas após a última imunização os animais foram desafiados com inoculação por via intracerebral (ic) de uma dose letal de DENV2 NGC (3,8
25 LD₅₀), neuroadaptado a camundongos. Em seguida, os animais foram avaliados diariamente até o 21º dia quanto à morbidade (desenvolvimento de paralisia, principalmente nos membros posteriores) e sobrevivência.

Os cronogramas das imunizações estão representados na

Figura 3. As Tabelas 1, 2 e 3 a seguir mostram os esquemas de imunização.

A Tabela 1 mostra o esquema de imunização do primeiro experimento com protocolo de dose e reforço (prime/boost) ou imunizações individuais.

TABELA 1

Grupos	Imunização
1	pE1D2 (2 doses im)
2	pE1D2 (2 doses im) + 17D-D2 (1 dose sc)
3	pE2D2 (2 doses im)
4	PE2D2 (2 doses im) + 17D-D2 (1 dose sc)
5	PcTPA (2 doses im)
6	pcTPA (2 doses im) + 17D-D2 (1 dose sc)
7	17D-D2 (1 dose sc)
8	17D-D2 (2 doses sc)
9	Não imunizado e somente desafiado com DENV2

A Tabela 2 mostra o esquema de imunização do segundo experimento com protocolo de dose e reforço (prime/boost) ou imunizações individuais.

TABELA 2

Grupos	Imunização
1	pE1D2 (2 doses im)
2	pE1D2 (2 doses im) + 17D-D2 (1 dose sc)
3	pE2D2 (2 doses im)
4	pE2D2 (2 doses im) + 17D-D2 (1 dose sc)
5	17D-D2 (2 doses sc)
6	17D-D2 (2 doses im)
7	Não imunizado e somente desafiado com DENV2

A Tabela 3 mostra o esquema de imunização do terceiro experimento com protocolo de imunização simultânea (co-administração).

TABELA 3

Grupos	Imunização
1	pE1D2 + 17D-D2 - 2 doses im
2	pE2D2 + 17D-D2 - 2 doses im
3	pcTPA + 17D-D2 - 2 doses im

Resultados de Proteção - Primeiro Experimento

5 No primeiro experimento os sinais clínicos da doença foram detectados entre o sétimo e o oitavo dia após o desafio com DENV2 nos grupos dos animais não imunizados ou aqueles que receberam o plasmídeo controle (pcTPA). Treze dias após o desafio, 100% destes camundongos apresentaram

10 paralisia ou morte. Por outro lado, 100% dos animais vacinados com somente 2 doses de pE1D2, 2 doses de pE1D2 + 1 dose de 17D-D2, ou 2 doses de 17D-D2, sobreviveram ao desafio.

Quanto ao aparecimento de sinais clínicos, somente o

grupo de camundongos imunizados com 2 doses de pE1D2 + 1 dose de 17D-D2 não apresentou qualquer sinal.

O grupo de animais que recebeu somente o plasmídeo pE1D2 ou o vírus 17D-D2 apresentou 10% e 20% de paralisia, respectivamente, conforme mostrado nas Figuras 3A e 3B.

A vacina pE2D2 se mostrou menos protetora quando comparada à vacina pE1D2. Somente 50% dos animais imunizados com 2 doses de pE2D2 sobreviveram ao desafio e 70% apresentaram morbidade. Por outro lado, 100% dos animais imunizados com 2 doses de pE2D2 + 1 dose de 17D-D2 sobreviveram ao desafio e somente 10% destes camundongos apresentaram algum sinal clínico da doença, conforme mostrado nas Figuras 3A e 3B.

Resultados de Proteção - Segundo Experimento

No segundo experimento as proporções de sobrevivência e morbidade nos grupos de animais imunizados com os plasmídeos pE1D2 e pE2D2 isoladamente ou no sistema de dose e reforço (vacina de DNA + 17D-D2) foram semelhantes aos dados obtidos no primeiro experimento. Mais uma vez a imunização no sistema de dose e reforço se mostrou mais eficiente gerando 100% de proteção, conforme Figuras 3C, 3D, 4C e 4D.

Resultados de Proteção - Terceiro Experimento

As imunizações simultâneas pE1D2 + 17D-D2 e pE2D2 + 17D-D2 se mostraram tão eficientes quanto as imunizações no sistema dose/reforço, induzindo proteção em 100% dos animais, independente da via de inoculação do vírus 17D-D2 (im ou sc), sem o aparecimento de qualquer sinal clínico da doença.

Nenhuma das vacinas administradas isoladamente (vacina de DNA ou químera 17D-D2) induziu proteção sem o desenvolvimento de paralisia em nenhum dos animais testados (Figuras 5).

5 Resultados de Soroneutralização

Para a detecção dos níveis de anticorpos neutralizantes gerados com as vacinas testadas, os soros dos animais foram coletados duas semanas após a imunização com as vacinas de DNA e/ou vírus quimérico (antes do desafio com DENV) e 21 dias após o desafio com DENV2. Nos ensaios de soroneutralização, os vírus DENV2 foram incubados com diferentes diluições dos soros dos camundongos imunizados e posteriormente foi avaliada a capacidade destes vírus infectar células Vero, através da formação das placas de lise. O título de anticorpos neutralizantes foi calculado a partir da redução de 50% das placas de lise (PRNT₅₀).

Os resultados estão exemplificados na tabela 4, com os soros dos animais utilizados no primeiro experimento de imunização no sistema de dose e reforço. Os resultados demonstram um aumento significativo dos níveis de anticorpos neutralizantes nos animais que receberam a imunização combinada no sistema de dose/reforço.

TABELA 4			
Títulos de anticorpos neutralizantes (PRNT ₅₀)			
Animais	2 doses da vacina pE1D2	2 doses pE1D2 + reforço 17D-D2	2 doses pE1D2 + reforço 17D-D2 + desafio

			DENV2
1	1:73	>1:640	>1:640
2	1:60	>1:640	>1:640
3	1:8	1:240	>1:640
4	1:24	1:33	1:120
5	ND	1:160	>1:640
6	1:40	ND	>1:640
7	1:47	1:448	>1:640
8	ND	1:533	>1:640
9	1:86	>1:640	>1:640
10	1:25	1:320	>1:640
Controle negativo - 2 doses pcTPA		<1:5	
Controle Positivo - soro de macaco imune		>1:640	

A presente invenção foi exemplificada para DENV2,
5 entretanto a construção de vacinas de DNA contra os demais sorotipos do vírus dengue (DENV 1,3 e 4), obedece a mesma metodologia aqui descrita para o DENV2.

A(s) composição(ões) da presente invenção podem conter um veículo farmacêutico aceitável. Qualquer veículo
10 farmacêutico conhecido daqueles especialistas na arte pode ser usado na(s) composição(ões) da presente invenção, dependendo do modo de administração.

O termo veículo farmacêutico se refere a um diluente, adjuvante, excipiente, ou um veículo com o qual a vacina de
15 DNA ou o vírus quimérico é administrado. Esses veículos farmacêuticos podem ser líquidos estéreis, tais como água e óleo, incluindo aqueles de origem animal, vegetal ou sintética. Excipientes farmacêuticos incluem amido, glucose, frutose, gelatina, malte, arroz, farinha, sílica

gel, estearato de sódio, monoestearato de glicerol, talco, cloreto de sódio, leite em pó desnatado, glicerol, propileno, glicol, água, etanol e semelhantes. A(s) composição(ões) da presente invenção, se desejado, podem
5 conter quantidades pequenas de agentes emulsificantes, ou agentes tamponadores de pH.

A presença de um veículo farmacêutico dependerá da administração da composição vacina. Por exemplo, para a administração parenteral, tal como uma injeção subcutânea,
10 o veículo preferido consiste de água, solução salina, álcool, gorduras, ceras ou solução tampão. Para administração oral, podem ser empregados, manitol, lactose, amido, estearato de magnésio, sacarina sódica, talco, celulose, glucose, sucrose e carbonato de magnésio.

15 Também podem ser usados agentes contendo uma substância para proteger o antígeno de rápido catabolismo, tal como hidróxido de alumínio ou óleo mineral.

A presente invenção utilizou inoculação das vacinas de DNA por via im com duas doses DNA, com 100µg por dose,
20 administradas em intervalo de duas semanas. Também podem ser utilizados números diferentes de doses (como uma, três, quatro, etc) com concentrações diferentes de DNA (variando de 0.1µg até 1g), e administradas em intervalos de tempo variados (de 1 semana até 1 ano entre cada dose de DNA).

25 As imunizações das vacinas de DNA da presente invenção foram realizadas por via im através de injeções com agulha. Outras vias de imunização também podem ser utilizadas como por exemplo por via intradérmica, subcutânea, transcutânea, intravenosa ou intraperitoneal. Tais inoculações podem ser

administradas com ou sem auxílio de agulha. Como exemplo de inoculação sem agulhas, podemos citar a utilização de inoculação por biobalística (*Genegun*), Biojector, adesivos (*pads*), etc.

5 Na nova abordagem de imunização da presente invenção, ou seja, o sistema de dose (vacina de DNA) e reforço (vírus quimérico 17D-D2) ou imunizações simultâneas (co-administração), as vacinas de DNA foram administradas por via im através de seringas com agulhas e o vírus quimérico
10 17D-D2 foi inoculado também com seringas por via im ou sc. Para esta abordagem também poderão ser utilizadas outras vias de inoculação com ou sem agulhas conforme exemplificado acima. As imunizações com vacinas de DNA e 17D-D2 foram administradas em intervalos de duas semanas,
15 tanto no sistema de dose e reforço quanto de co-administração. Tais inoculações também podem ser realizadas com intervalos de tempo variados (de 1 semana até 5 anos), com diferentes doses (uma, duas, três e etc). As concentrações das vacinas de DNA inoculadas (100 µg por
20 dose) assim como dos vírus quiméricos (4 log 10 PFU) também podem variar conforme adequação do protocolo.

No sistema de dose e reforço da presente invenção, a primeira imunização (dose) foi realizada com vacinas de DNA enquanto que o reforço foi dado pela imunização com vírus
25 quimérico. Também é possível inverter este protocolo, com a primeira imunização com vírus quiméricos e o reforço com vacinas de DNA, administradas em intervalos variados.

A presente invenção utilizou o gene que codifica a proteína E do vírus da dengue. Também podem ser utilizados

outros genes deste vírus, tais como as seqüências que codificam as proteínas C (capsídeo), prM (membrana), NS1 (não-estrutural 1) e NS3 (não-estrutural 3). A proteína NS1 já foi testada em vacinas de DNA isoladas demonstrando potencial protetor contra o vírus da dengue (Costa et al., 2006, 2007).

A nova abordagem de imunização da presente invenção utiliza vacinas de DNA e vírus quimérico vacinal de febre amarela com genes do vírus da dengue (17D-D2). Esta abordagem também pode ser utilizada com vacinas de DNA e vírus quimérico vacinal 17D contendo genes de outros flavivírus. A abordagem também pode ser usada com vacinas de DNA contendo genes de febre amarela e vírus vacinal 17D.

Assim, de acordo com a presente invenção é fornecida uma vacina efetiva contra o vírus dengue. Adicionalmente, a invenção também demonstrou um novo método para induzir resposta imune contra vírus da dengue baseado em vacinas de DNA e vírus quiméricos 17D em imunizações combinadas, no sistema de dose (vacina de DNA) e reforço (vírus quimérico) ou co-administração simultânea das duas estratégias vacinais (vacinas de DNA e vírus quiméricos em uma mesma formulação). Uma composição vacinal e um kit compreendendo vacinas de DNA contra os quatro sorotipos do vírus dengue vírus quiméricos também é apresentado na presente invenção.

Referências

[1] Barrett AD. Current status of flavivirus vaccines. Ann N Y Acad Sci. 2001, 951: 262-71

[2] Blair PJ, Kochel TJ, Raviprakash K, Guevara C, Salazar M, Wu SJ, Olson JG, Porter KR. Evaluation of immunity and

protective efficacy of a dengue-3 pre-membrane and envelope DNA vaccine in *Aotus nancymae* monkeys. *Vaccine*. 2006, 24:1427-32.

[3] Caufour, P.S., Motta, M.C.A., Yamamura, A.M.Y.,
5 Vazquez, S., Ferreira, I.I., Jabor, A.V., Bonaldo, M.C.,
Freire, M.S. & Galler, R. Construction, characterization
and immunogenicity of recombinant yellow fever 17D-dengue
type 2 viruses. *Virus Res.*, 2001 79:1-14).

[4] Chang GJ. Molecular biology of dengue viruses. In:
10 Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever, Gubler, D.J.;
Kuno, G. (eds), CAB International Publisher, 1997, pp. 175-
198.

[5] Chen S, Yu M, Jiang T, Deng Y, Qin C, Qin E. Induction
of tetravalent protective immunity against four dengue
15 serotypes by the tandem domain III of the envelope protein.
DNA Cell Biol. 2007, 26:361-7.

[6] Costa SM, Paes MV, Barreto DF, Pinhao AT, Barth OM,
Queiroz JL, Armoa GR, Freire MS & Alves AMB. Protection
against dengue type 2 virus induced in mice immunized with
20 a DNA plasmid encoding the non-structural 1 (NS1) gene
fused to the tissue plasminogen activator signal sequence.
Vaccine 2006, 24: 195-105.

[7] Costa S.M., Azevedo A.S., Paes M.V., Sarges F.S.,
Freire M.S. & Alves A.M. DNA vaccines against dengue virus
25 based on the ns1 gene: the influence of different signal
sequences on the protein expression and its correlation to
the immune response elicited in mice. *Virology* 2007,
358:413-423.

[8] Encke J, zu Putlitz J, Geissler M, Wands JR. Genetic

immunization generates cellular and humoral immune responses against the nonstructural proteins of the hepatitis C virus in a murine model. *J. Immunol.* 1998, 161: 4917-23.

- 5 **[9]** Galler R, Marchevsky RS, Caride E, Almeida LF, Yamamura AM, Jabor AV, Motta MC, Bonaldo MC, Coutinho ES, Freire MS. Attenuation and immunogenicity of recombinant yellow fever 17D-dengue type 2 virus for rhesus monkeys. *Braz J Med Biol Res.* 2005, 38:1835-46.
- 10 **[10]** Kinney RM & Huang CY-H Development of new vaccines against dengue fever and japanese encefalitis. *Intervirology* 2001, 44: 176-197.
- [11]** Kochel T., Wu S.-J., Raviprakash K., Hobart P., Hoffman S., Porter K. & Hayes, C. Inoculation of plasmids
15 expressing the dengue-2 envelope gene elicit neutralizing antibodies in mice. *Vaccine* 1997, 15: 547-552.
- [12]** Lin YL, Chen LK, Liao CL, Yeh CT, Ma SH, Chen JL, Huang YL, Chen SS, Chiang HY. DNA immunization with Japanese encephalitis virus nonstructural protein NS1
20 elicits protective immunity in mice. *J Virol.* 1998, 72: 191-200.
- [13]** Marchevsky RS, Mariano J, Ferreira VS, Almeida E, Cerqueira MJ, Carvalho R, Pissurno JW, Travassos da Rosa APA, Simões MC, Santos CND, Ferreira II, Muylaert IR, Mann
25 GF, Rice CM and Galler R. Phenotypic analysis of yellow fever virus derived from complementary DNA. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1995, 52:75-80.
- [14]** Phillpotts RJ, Venugopal K, Brooks T. Immunisation with DNA polynucleotides protects mice against lethal

challenge -with St. Louis encephalitis virus. Arch Virol. 1996, 141:743-749.

[15] Pennica D, Holmes WE, Kohr WJ, Harkins RN, Vehar GA, Ward CA, Bennett WF, Yelverton E, Seeburg PH, Heyneker HL, 5 Goeddel DV, Collen D. Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in E. coli. Nature 1983,301:214-21.

[16] Putnak R, Fuller J, VanderZanden L, Innis BL, Vaughn DW. Am J Trop Med Hyg. Vaccination of rhesus macaques 10 against dengue-2 virus with a plasmid DNA vaccine encoding the viral pre-membrane and envelope genes. 2003, 68:469-76.

[17] Raviprakash K., Porter K.R., Kochel T.J, Ewing D., Simmons M., Phillips I, Murphy G.S., Weiss W.R. & Hayes C.G. Dengue virus type 1 DNA vaccine induces protective 15 immune responses in rhesus macaques. J. Gen. Virol. 2000, 81: 1569-1667.

[18] Rice CM, Grakoui A, Galler R, Chambers TJ. Transcription of infectious yellow fever RNA from full-length cDNA templates produced by in vitro ligation. New 20 Biol. 1989, 1:285-96.

[19] Ruggli N; Tratschin J-D.; Mittelholzer C; Hofmann MA. Nucleotide sequence of classical swine fever virus strain Alfort/187 and Transcription of infectious RNA from stably cloned full-length cDNA. 1996, J. Virol. 70:3478-3487.

25 [20] Wu SF, Liao CL, Lin YL, Yeh CT, Chen LK, Huang YF, Chou HY, Huang JL, Shaio MF & Sytwu HK. Evaluation of protective efficacy and immune mechanisms of using a non-structural protein NS1 in DNA vaccine against dengue 2 virus in mice. Vaccine 2003, 21, 3919-3929.

ListSeqPatentIn35_ST25.txt
SEQUENCE LISTING

<110> Fundação Oswaldo Cruz

<120> MÉTODO, KIT, PLASMÍDEO E COMPOSIÇÃO PARA INDUZIR RESPOSTA IMUNE CONTRA VÍRUS DA DENGUE BASEADO VÁGINAS DE DNA E VÍRUS QUIMÉRICOS

<130> P1692

<160> 9

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 28

<212> DNA

<213> Homo sapiens (primer senso t-PA)

<400> 1
ggggaagctt atggatgcaa tgaagagg 28

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens (primer antisenso t-PA)

<400> 2
ggggatatcg ctgggcgaaa cgaagac 27

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Vírus dengue sorotipo 2 (primer senso E80%)

<400> 3
gggggatatc atgcgttgca taggaatatc 30

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Vírus dengue sorotipo 2 (primer antisenso E80%)

<400> 4
ggggtctaga ttacgataga acttcctttc 30

<210> 5

<211> 28

<212> DNA

<213> Vírus dengue sorotipo 2 (primer senso domínio III E)

<400> 5
gggggatatc ggaatgtcat actctatg 28

<210> 6

<211> 1203

<212> DNA

<213> Vírus dengue sorotipo 2 (E80%)

<400> 6
atgcgttgca taggaatatc aaatagagac tttgtagaag gggtttcagg aggaagctgg 60
gttgacatag tcttagaaca tggaagctgt gtgacgacga tggcaaaaaa caaaccaaca 120

ListSeqPatentIn35_ST25.txt

ttggattttg aactgataga aacagaagcc aaacaacctg ccactctaag gaagtactgt	180
atagaggcaa agctgaccaa cacaacaaca gattctcgct gccaacaca aggagaaccc	240
agcctaaatg aagagcagga caaaagggtt gtctgcaaac actccatggt ggacagagga	300
tggggaaatg gatgtggact atttgaaaaa ggaggcattg tgacctgtgc tatgttcaca	360
tgcaaaaaga acatgaaagg aaaagtcgtg caaccagaaa acttgggaata caccattgtg	420
ataacacctc actcagggga agagcatgca gtcggaaatg acacaggaaa acatggcaag	480
gaaatcaaaa taacaccaca gagttccatc acagaagcag agttgacagg ctatggcact	540
gtcacgatgg agtgctctcc gagaacgggc ctcgacttca atgagatggt gttgctgcaa	600
atggaaaata aagcttggct ggtgcacagg caatggttcc tagacctgcc gttgccatgg	660
ctgcccggag cggacacaca aggatcaaat tggatacaga aagagacatt ggtcactttc	720
aaaaatcccc atgcgaagaa acaggatggt gttgttttgg gatcccaaga aggggccatg	780
cacacagcac tcacaggggc cacagaaatc cagatgtcat caggaaactt actgttcaca	840
ggacatctca agtgcaggct gaggatggac aaactacagc tcaaaggaat gtcatactct	900
atgtgcacag gaaagttaa agttgtgaag gaaatagcag aaacacaaca tggacaata	960
gttatcagag tacaatatga aggggacggg tctccatgta agatcccttt tgagataatg	1020
gatttgga aaagacatgt tttaggctgc ctgattacag tcaaccaat cgtaacagaa	1080
aaagatagcc cagtcaacat agaagcagaa cctccattcg gagacagcta catcatcata	1140
ggagtagagc cgggacaatt gaagctcaac tggtttaaga aaggaagttc tatcgtaatc	1200
tag	1203

<210> 7
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> Virus dengue sorotipo 2 (domIII E)

<400> 7	
ggaatgtcat actctatgtg cacaggaaag tttaaagttg tgaaggaaat agcagaaaca	60
caacatggaa caatagttat cagagtacaa tatgaagggg acggttctcc atgtaagatc	120
ccttttgaga taatggattt ggaaaaaaga catgttttag gtcgcctgat tacagtcaac	180
ccaatcgtaa cagaaaaaga tagcccagtc aacatagaag cagaacctcc attcgagagc	240
agctacatca tcataggagt agagccggga caattgaagc tcaactggtt taagaaagga	300
agttctatcg taatctag	318

<210> 8
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens (peptideo sinal t-PA)

<400> 8	
atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt	60
tcgcccagc	69

ListSeqPatentIn35_ST25.txt

<210> 9
 <211> 1983
 <212> DNA
 <213> Virus dengue (prM/E)

<400> 9
 ttccatttaa ccacacgtaa cggagaacca cacatgatcg tcagtagaca agagaaaggg 60
 aaaagtcttc tgtttaaaac agaggatggg gtgaacatgt gtaccctcat ggccatggac 120
 cttggtgaat tgtgtgaaga tacaatcacg tacaagtgtc cttttctcaa gcagaatgaa 180
 ccagaagaca tagattgttg gtgcaactct acgtccacat gggtaactta tgggacgtgt 240
 accaccacag gagaacacag aagagaaaaa agatcagtgg cactcgttcc acatgtggga 300
 atgggactgg agacacgaac tgaaacatgg atgtcatcag aaggggcctg gaaacatgcc 360
 cagagaattg aaacttggat cttgagacat ccaggcttta ccataatggc agcaatcctg 420
 gcatacacca taggaacgac acatttccaa agagccctga ttttcatctt actgacagct 480
 gtcgctcctt caatgacaat gcgttgcata ggaatatcaa atagagactt tgtagaaggg 540
 gtttcaggag gaagctgggt tgacatagtc ttagaacatg gaagctgtgt gacgacgatg 600
 gcaaaaaaca aaccaacatt ggattttgaa ctgatagaaa cagaagccaa acaacctgcc 660
 actctaagga agtactgtat agaggcaaaag ctgaccaaca caacaacaga ttctcgtgc 720
 ccaacacaag gagaaccag cctaaatgaa gagcaggaca aaagggttcgt ctgcaaacac 780
 tccatggtgg acagaggatg gggaaatgga tgtggactat ttggaaaagg aggcatgtg 840
 acctgtgcta tgttcacatg caaaaagaac atgaaaggaa aagtcgtgca accagaaaac 900
 ttggaatata ccatttgtat aacacctcac tcaggggaag agcatgcagt cggaaatgac 960
 acaggaaaac atggcaagga aatcaaaata acaccacaga gttccatcac agaagcagag 1020
 ttgacaggct atggcactgt cacgatggag tgctctccga gaacgggcct cgacttcaat 1080
 gagatggtgt tgctgcaa at ggaaaataaa gcttggtggtg tgcacaggca atggttccta 1140
 gacctgccgt tgccatggct gcccgagcg gacacacaag gatcaaattg gatacagaaa 1200
 gagacattgg tcactttcaa aaatccccat gcgaagaaac aggatgttgt tgttttggga 1260
 tccaagaag gggccatgca cacagcactc acaggggcca cagaaatcca gatgtcatca 1320
 ggaaacttac tgttcacagg acatctcaag tgcaggctga ggatggacaa actacagctc 1380
 aaaggaatgt catactctat gtgcacagga aagtttaaag ttgtgaagga aatagcagaa 1440
 acacaacatg gaacaatagt tatcagagta caatatgaag gggacggttc tccatgtaag 1500
 atcccttttg agataatgga tttggaaaaa agacatgttt taggtcgcct gattacagtc 1560
 aaccaatcg taacagaaaa agatagccca gtcaacatag aagcagaacc tccattcgga 1620
 gacagctaca tcatcatagg agtagagccg ggacaattga agctcaactg gtttaagaaa 1680
 ggaagttcta tcggccaaat gattgagaca acaatgaggg gagcgaagag aatggccatt 1740
 ttaggtgaca cagcttggga ttttgatcc ctgggaggag tgtttacatc tataggaaaag 1800
 gctctccacc aagttttcgg agcaatctat ggggctgcct tcagtggggg ctcattggatt 1860

ListSeqPatentIn35_ST25.txt

atgaaaatcc tcataggagt cattatcaca tggataggaa tgaattcacg cagcacctca	1920
ctgtctgtgt cactagtatt ggtgggagtc gtgacgctgt atttgggagt tatggtgcag	1980
gcc	1983

REIVINDICAÇÕES

1. Método para induzir resposta imune contra vírus da dengue **caracterizado** por compreender a administração a um paciente de vacinas de DNA e vírus quiméricos 17D.

5 2. Método de acordo com a reivindicação 1 **caracterizado** pela administração ao paciente ser efetuada em imunizações combinadas, no sistema de dose (vacinas de DNA) e reforço (vírus quiméricos) ou co-administração simultânea das duas estratégias vacinais (vacinas de DNA e
10 vírus quiméricos em uma mesma formulação).

3. Composição vacinal contra o vírus dengue **caracterizado** por compreender:

(a) Vacinas de DNA contra os quatro sorotipos do vírus dengue a partir da construção de diferentes
15 plasmídeos recombinantes contendo os genes que codificam as proteínas E a partir de cada sorotipo viral do vírus dengue, ou somente as seqüências que correspondem aos domínios III destas proteínas, todas fusionadas à seqüência que codifica o peptídeo sinal do ativador de plasminogênio
20 de tecido humano (t-PA);

(b) Vírus quiméricos compreendendo o vírus vacinal de febre amarela 17D modificado, pela tecnologia de obtenção de clone infeccioso, com a substituição das seqüências que codificam as proteínas prM e E de febre amarela pelas
25 seqüências que codificam as proteínas prM e E dos vírus dengue dos diferentes sorotipos; e,

(c) um veículo farmacêuticamente aceitável.

4. Composição de acordo com a reivindicação 3 **caracterizado** a vacina de DNA por compreender:

- plasmídeo pE1 construído com a inserção da sequência que codifica 80% da proteína do envelope viral (E) do vírus da dengue, sem a porção C-terminal da proteína E do vírus da dengue.

5 5. Composição de acordo com a reivindicação 3
caracterizado a vacina de DNA por compreender:

 - um plasmídeo pE2 construído com a inserção da sequência que codifica o domínio III da proteína E do vírus da dengue, contida entre os nucleotídeos 1822 e 2125 do
10 genoma completo do vírus da dengue.

 6. Kit **caracterizado** por compreender:

 (a) Vacinas de DNA contra os quatro sorotipos do vírus dengue a partir da construção de diferentes plasmídeos recombinantes contendo os genes que codificam as proteínas
15 E a partir de cada sorotipo viral do vírus dengue, ou somente as sequências que correspondem aos domínios III destas proteínas, todas fusionadas à sequência que codifica o peptídeo sinal do ativador de plasminogênio de tecido humano (t-PA); e,

20 (b) vírus quiméricos compreendendo o vírus vacinal de febre amarela 17D modificado, pela tecnologia de obtenção de clone infeccioso, com a substituição das sequências que codificam as proteínas prM e E de febre amarela pelas sequências que codificam as proteínas prM e E dos vírus
25 dengue dos diferentes sorotipos.

 7. Plasmídeo recombinante contendo o gene da proteína E a partir de cada sorotipo viral do vírus dengue fusionado à sequência que codifica o peptídeo sinal do t-PA
caracterizado por ser construído com a inserção da

seqüência que codifica 80% da proteína do envelope viral (E) do vírus da dengue sem a porção C-terminal da proteína E, onde a dita seqüência é amplificada utilizando os oligonucleotídeos senso e antisenso, identificados como SEQ ID NO:3 e SEQ ID NO:4 e em seguida efetuada a clonagem da seqüência no plasmídeo pCTPA entre os sítios das enzimas de restrição *EcoRV* e *XbaI* no mesmo quadro aberto de leitura da seqüência que codifica o peptídeo sinal t-PA, gerando o plasmídeo recombinante.

8. Plasmídeo de acordo com a reivindicação 7 **caracterizado** por a seqüência que codifica 80% da proteína do envelope viral (E) do vírus da dengue estar contida entre os nucleotídeos 937 e 213125 do genoma completo do DENV2, cepa Nova Guiné C (NGC) (Genebank: M29095).

9. Plasmídeo recombinante contendo o gene da proteína E a partir de cada sorotipo viral do vírus dengue fusionado à seqüência que codifica o peptídeo sinal do t-PA **caracterizado** por ser construído com a inserção da seqüência que codifica o domínio III da proteína E do vírus da dengue, onde a dita seqüência é amplificada utilizando os oligonucleotídeos senso e antisenso, identificados como SEQ ID NO:5 e SEQ ID NO:4, entre os sítios para as enzimas de restrição *EcoRV* e *XbaI* e em seguida realizada a clonagem da seqüência no plasmídeo pCTPA entre os sítios das enzimas de restrição *EcoRV* e *XbaI*, no mesmo quadro aberto de leitura da seqüência que codifica o peptídeo sinal t-PA, gerando o plasmídeo recombinante.

10. Plasmídeo de acordo com a reivindicação 9 **caracterizado** por a seqüência que codifica o domínio III da

proteína E do vírus da dengue estar contida entre os nucleotídeos 1822 e 213125 do genoma completo de DENV2, cepa NGC (Genebank: M29095).

Figuras 1A, 1B, 1C

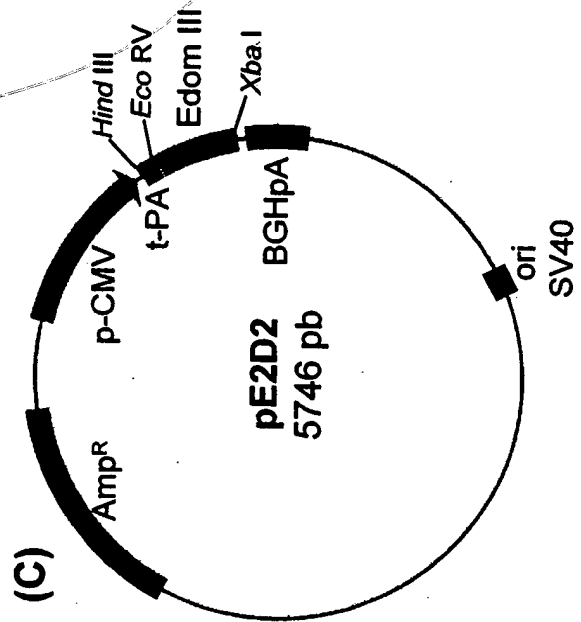
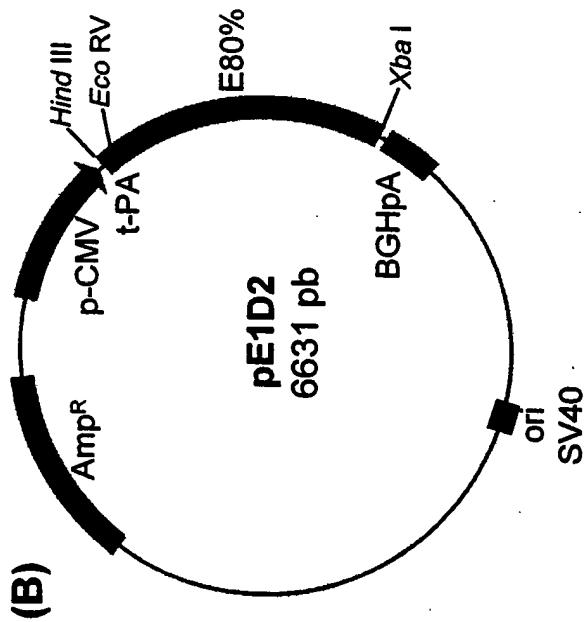
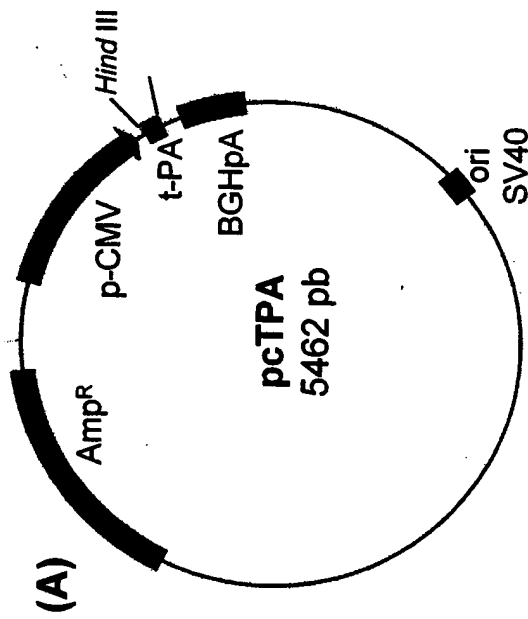
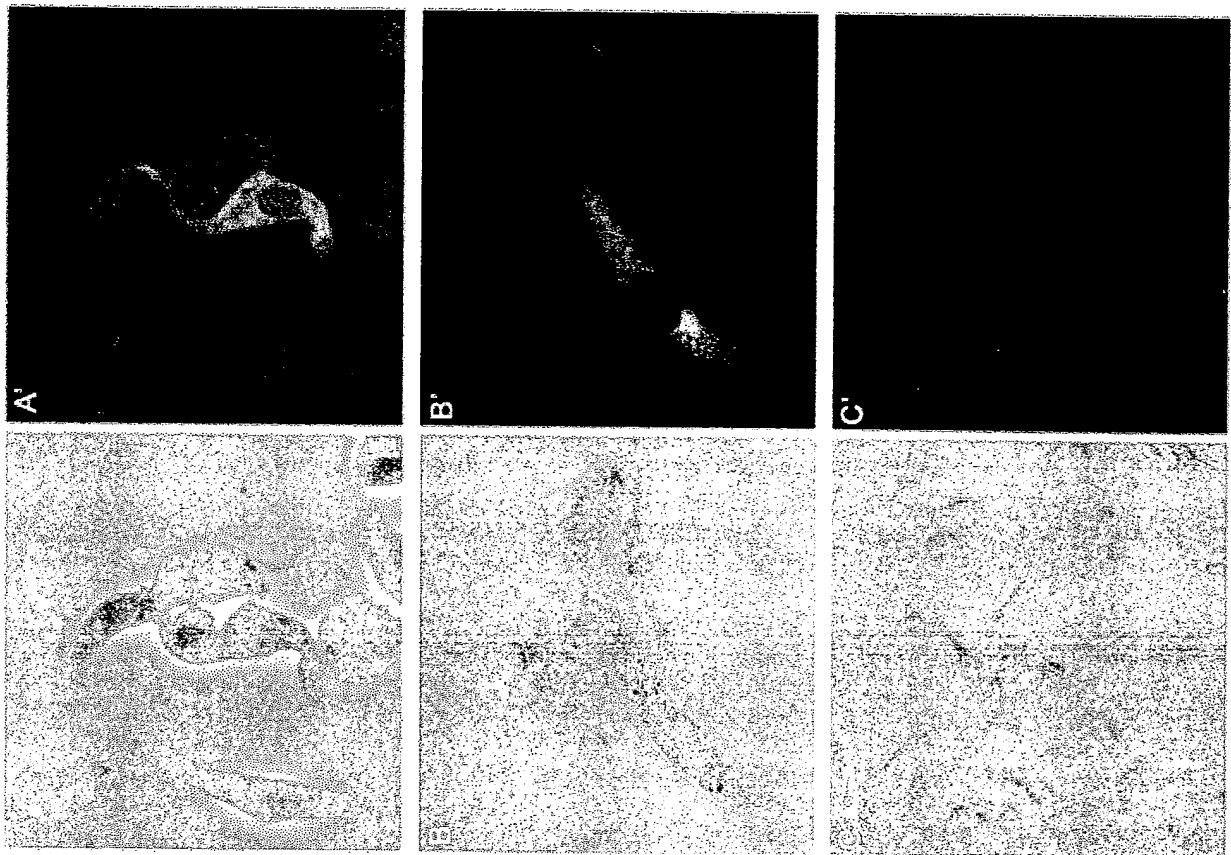
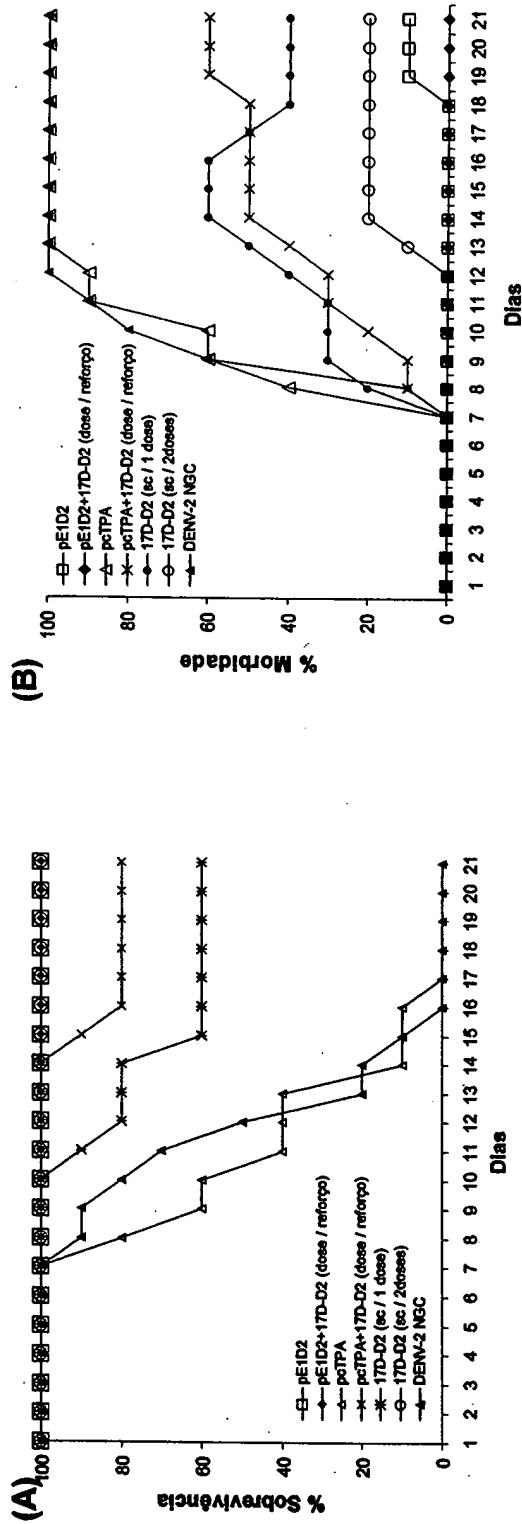


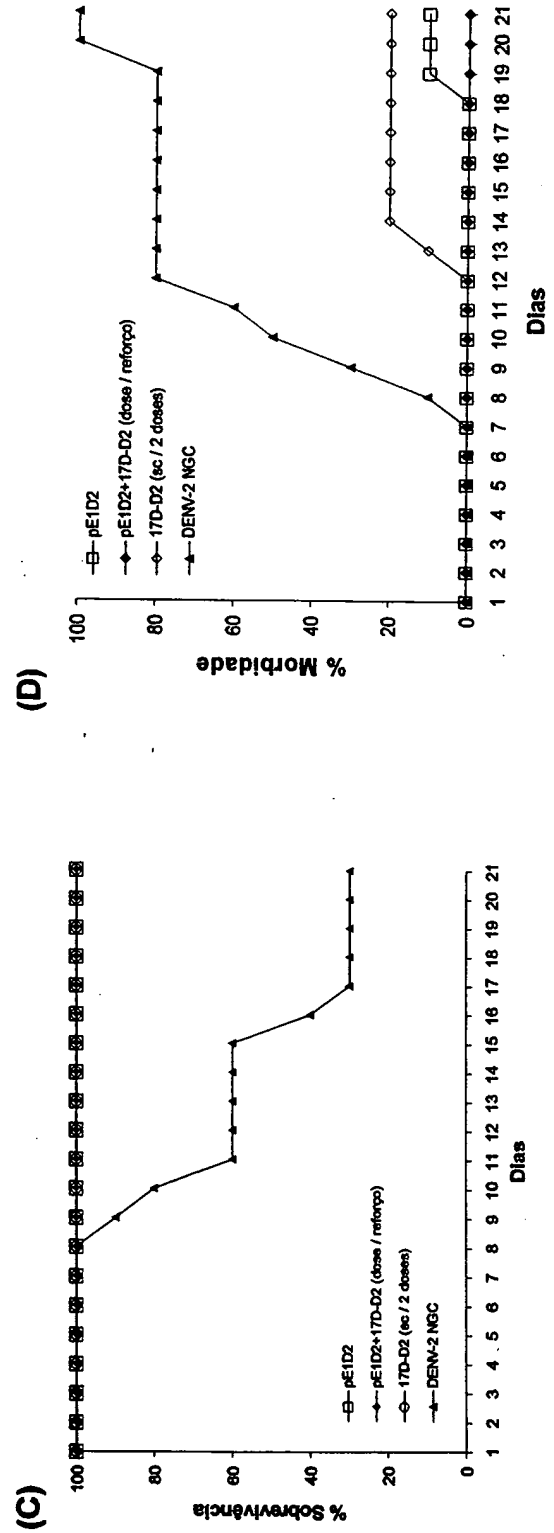
Figura 2

Figuras 3A, 3B, 3C, 3D

pE1D2 – 1º Experimento

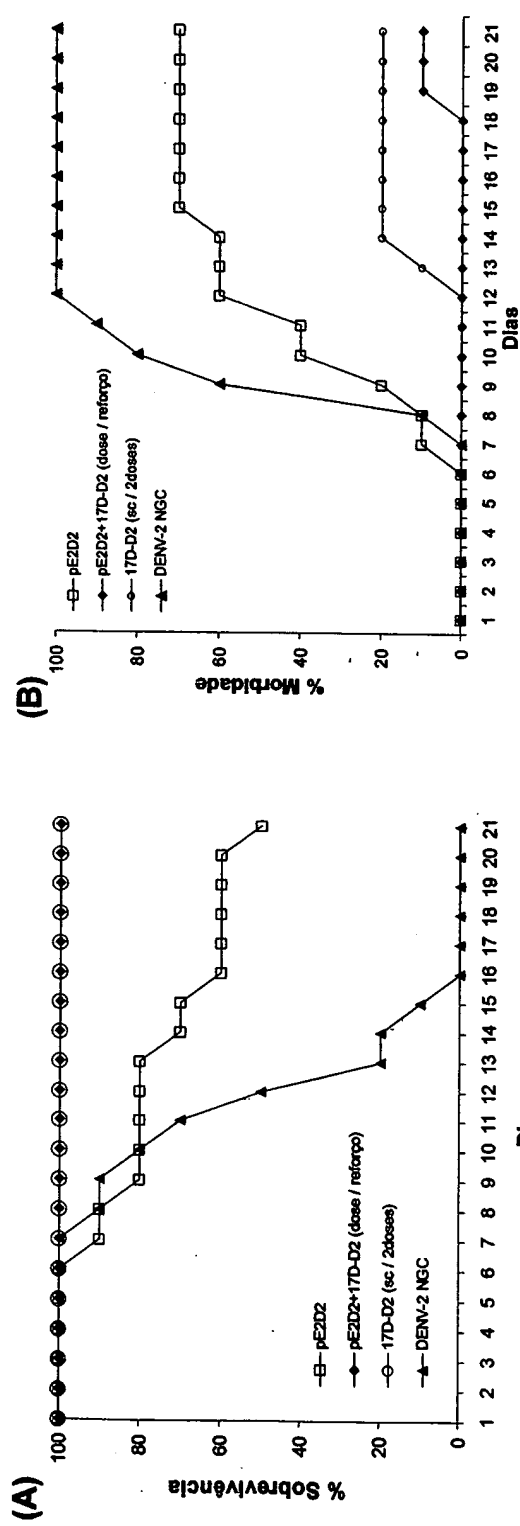


pE1D2 – 2º Experimento

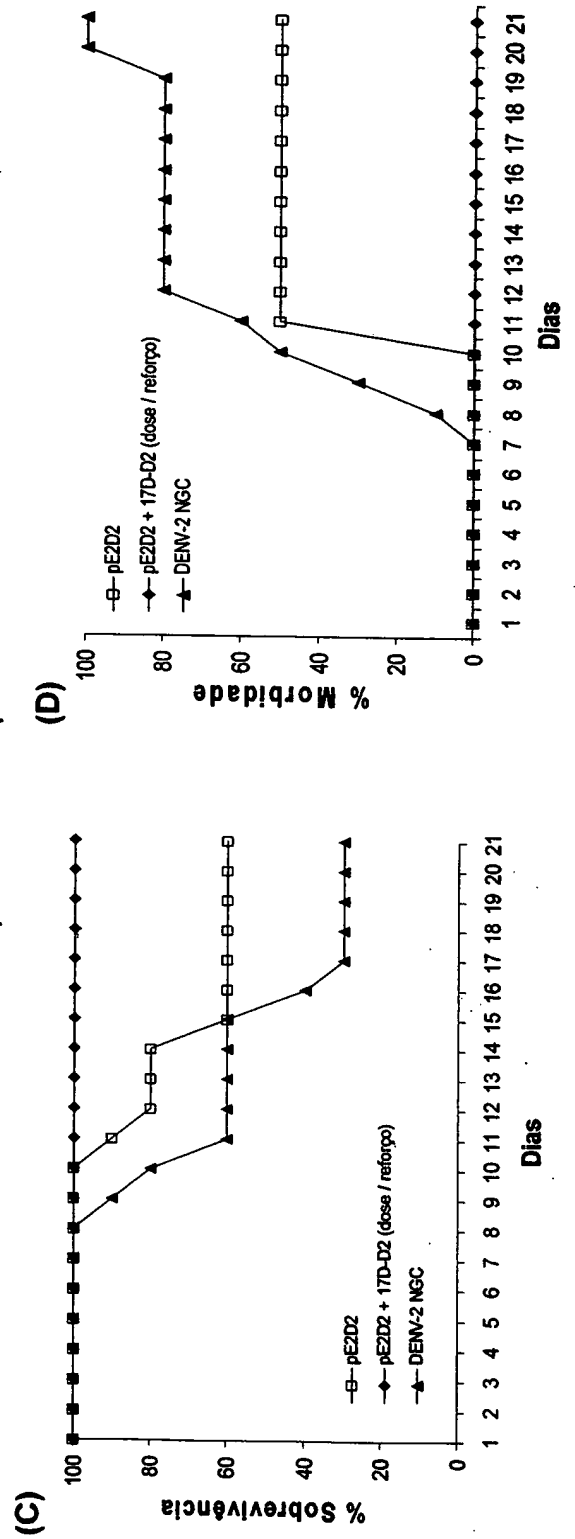


Figuras 4A, 4B, 4C, 4D

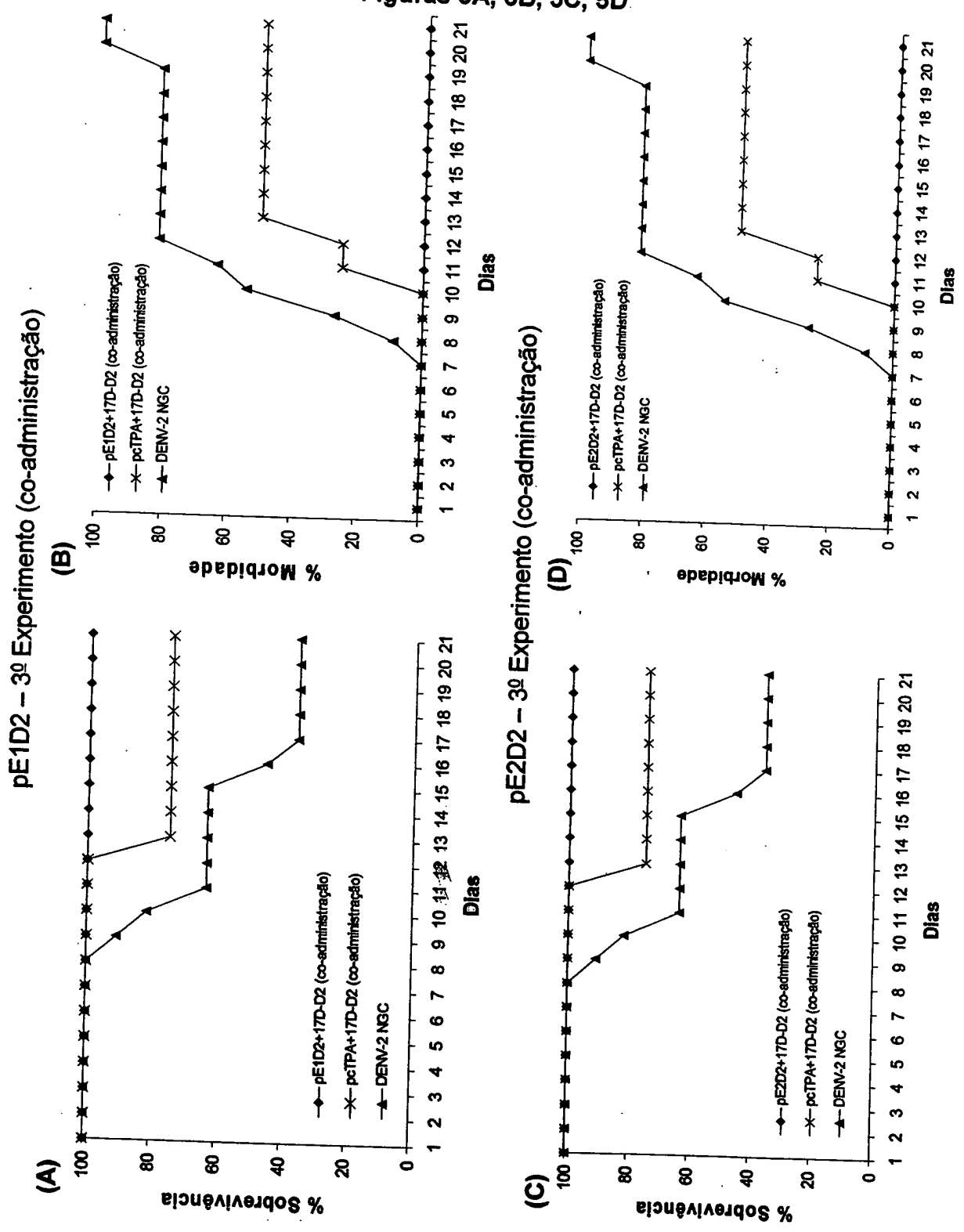
pE2D2 - 1º Experimento



pE2D2 - 2º Experimento



Figuras 5A, 5B, 5C, 5D



P-0904020-0

RESUMO

METODO, KIT, PLASMÍDEO E COMPOSIÇÃO PARA INDUZIR RESPOSTA IMUNE CONTRA VÍRUS DA DENGUE BASEADO EM VACINAS DE DNA E VÍRUS QUIMÉRICOS

5 A presente invenção se refere a um método para induzir resposta imune contra vírus da dengue baseado em vacinas de DNA e vírus quiméricos 17D em imunizações combinadas ou co-administradas. Também estão dentro do escopo da presente invenção, vacinas de DNA contra os quatro sorotipos do
10 vírus dengue a partir da construção de diferentes plasmídeos recombinantes contendo o gene que codifica a proteína E, ou somente a sequência que corresponde ao domínio III desta proteína, a partir de cada sorotipo viral do vírus dengue (DENV1-4). A invenção fornece ainda uma
15 composição vacinal consistindo de (a) vacinas de DNA contra os quatro sorotipos do vírus dengue, (b) vírus quiméricos compreendendo o vírus vacinal de febre amarela 17D modificado; e (c) um veículo farmacêuticamente aceitável, está incluído no escopo de proteção.