



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 315 221**

51 Int. Cl.:
C12N 7/04 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **00420113 .3**
96 Fecha de presentación : **30.05.2000**
97 Número de publicación de la solicitud: **1159968**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.12.2001**

54 Título: **Cepas atenuadas del virus del Dengue y su utilización en una composición vacvínea.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2009

73 Titular/es: **Mahidol University**
198/2 Trok Wat Saowakon
Bang Yi Khan - Bangkok-Noi
Bangkok 10700, TH

72 Inventor/es: **Bhamaraprat, Nath y**
Yoksan, Sutee

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 315 221 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Cepas atenuadas del virus del Dengue y su utilización en una composición vacvínea.

5 La invención se refiere al campo de los virus del Dengue y, más particularmente, a cepas atenuadas del virus del Dengue, así como a una composición vacunal que comprende al menos una de estas cepas.

10 El Dengue, así como su forma grave, la fiebre hemorrágica, es una enfermedad tropical de origen viral. El virus responsable forma parte de la familia de los Flaviviridae (género Flavivirus), que comprende igualmente el virus de la fiebre amarilla así como el de la encefalitis japonesa. Se conocen 4 serotipos susceptibles de provocar el Dengue. Aunque esta enfermedad está actualmente en progresión en el mundo, actualmente no hay ninguna vacuna disponible comercialmente. En efecto, para poder proponer con todas las garantías de prevenir eficazmente el Dengue, una vacuna debe, presentando garantías de inocuidad, ser capaz de inducir en el individuo al que se administra una respuesta del sistema inmunitario susceptible de protegerlo durante una contaminación posterior con virus salvajes. 15 Ahora bien, hasta el momento, ninguna de las vacunas candidatas estudiadas ha presentado todas las cualidades necesarias.

20 Por lo tanto, existe una necesidad de disponer de cepas del virus del Dengue suficientemente atenuadas para poder administrarse con total seguridad a los seres humanos y principalmente a los niños, conservando un poder de infección y un carácter inmunógeno suficientes para inducir una respuesta inmunitaria que permita una prevención de la enfermedad.

25 Con el fin de conseguir este objetivo, la invención propone una cepa aislada atenuada del serotipo 1 del virus del Dengue, designada con la referencia 16007 PDK 13 y depositada en la CNCM del Instituto Pasteur de París con la referencia I-2480.

La invención tiene igualmente por objeto una cepa aislada atenuada del serotipo 2 del virus del Dengue, designada con la referencia 16881 PDK 53 y depositada en la CNCM del Instituto Pasteur de París con la referencia I-2481.

30 La invención tiene igualmente por objeto una cepa aislada atenuada del serotipo 3 del virus del Dengue, designada con la referencia 16562 PGMK 30-FrhL 3 y depositada en la CNCM del Instituto Pasteur de París con la referencia I-2482.

35 La invención tiene también por objeto una cepa aislada atenuada del serotipo 4 del virus del Dengue, designada con la referencia 1036 PDK 48 y depositada en la CNCM del Instituto Pasteur de París con la referencia I-2483.

40 La invención tiene igualmente por objeto una composición vacunal que comprende al menos una cepa atenuada del virus del Dengue elegida entre las cepas siguientes: la cepa I-2480, la cepa I-2481, la cepa I-2482 y la cepa I-2483 o una cepa que se deriva de una de ellas.

La invención tiene igualmente por objeto la utilización de una cepa atenuada del virus del Dengue elegida entre las cepas siguientes: la cepa I-2480, la cepa I-2481, la cepa I-2482 y la cepa I-2483 o cualquier cepa derivada de ellas para la fabricación de una composición vacunal.

45 La invención tiene igualmente por objeto un método de inmunización contra el Dengue, según el cual se administra a adultos o a niños, una composición vacunal que comprende al menos una cepa atenuada del virus del Dengue elegida entre las cepas siguientes: la cepa I-2480, la cepa I-2481, la cepa I-2482 y la cepa I-2483 o una cepa derivada de ellas.

50 Todas las cepas de virus según la presente invención se han obtenido a partir del suero de pacientes que han padecido el Dengue en el Sudeste Asiático. Los aislamientos se propagaron en células de mamíferos y se inocularon por vía intratorácica (IT) a mosquitos del ganado (*Toxorhynchites* o *Aedes aegypti*). Esta etapa permitió eliminar virus contaminantes eventuales que no sean arbovirus; en efecto, sólo los arbovirus migran a nivel de las glándulas salivares del mosquito después de una administración intratorácica; por lo tanto fue preciso separar la cabeza del resto del cuerpo del mosquito y triturarla para obtener la cepa viral purificada. 55

A continuación, los virus de los serotipos 1, 2 y 4 se propagaron en células primarias de riñón de perro (PDK), a 32°C, cada 5 a 10 días, mientras que el virus del serotipo 3 se atenuó por propagación en células de riñón de mono (PGMK) y se cultivó en células pulmonares de feto Rhesus (FRhL). 60

Las cepas atenuadas que se obtienen tienen las características siguientes:

65 - Cuando se efectúan titulaciones en células de mamíferos, por ejemplo en células LLC-MK2 que son células procedentes de riñón de mono, las cepas atenuadas dan lugar a halos de lisis pequeños comparativamente con las cepas parentales de las que derivan.

- En los ratoncillos recién nacidos, cuando se inoculan por vía intracerebral, tienen una virulencia baja.

- En el mono, cuando se inoculan por vía subcutánea, provocan una viremia baja (incluso no detectable).
- Son sensibles a una temperatura cercana a 40°C.

En los términos de la presente invención, se entiende por cepa derivada de las cepas que son el objeto de los depósitos de la CNCM I-2480, I-2481, I-2482 y I-2483, las cepas virales obtenidas a partir de estas cepas, pero que se han sometido a propagaciones adicionales en células permisivas a los virus, conservando las propiedades mencionadas anteriormente.

La cepa 16007, del serotipo 1, se aisló en 1964 de un paciente afectado de Dengue asociado a un síndrome de choque en Tailandia. El suero virémico original se propagó en cultivos de tejido antes de inocularse en el mosquito *Toxorhynchites amboinensis*. A continuación, el virus obtenido se propagó en células PGMK para preparar la siembra viral madre. La siembra se propagó en células PDK, hasta 43 veces. La cepa obtenida después de 13 propagaciones en células PDK presenta todas las características de atenuación para una utilización vacunal; la que forma el objeto del depósito I-2480 efectuado en la CNCM.

Aunque esta cepa sea la preferida para la composición vacunal según la invención, es totalmente posible utilizar una cepa derivada de ella y principalmente una cepa que se haya sometido a algunas propagaciones adicionales en células PDK o una cepa que se haya cultivado posteriormente en células que la permitan conservar su carácter inmunógeno sin disminuir su carácter virulento. Así, podrían convenir igualmente las cepas que se hayan cultivado en células VERO. Se considera que cualquier cepa derivada de la cepa I-2480 forma parte de la presente invención.

La cepa 16681, del serotipo 2, se aisló de un paciente que representaba un caso fatal de Dengue en Tailandia en 1964. Esta cepa se propagó 2 veces en los mosquitos *Toxorhynchites amboinensis* y una vez en células de riñón de mono para producir la siembra madre. La cepa 16681 PDK 53 que es conveniente para los fines de la invención y que es objeto del depósito I-2481 efectuado en la CNCM, se obtuvo después de 53 propagaciones sucesivas semanales en células PDK.

Aunque esta cepa sea la preferida para la composición vacunal según la invención, es totalmente posible utilizar una cepa derivada de ella y principalmente una cepa que se haya sometido a algunas propagaciones adicionales en células PDK o una cepa que se haya cultivado posteriormente en células que la permitan conservar su carácter inmunógeno sin disminuir su carácter virulento. Así, podrían convenir igualmente las cepas que se hayan cultivado en células VERO. Se considera que cualquier cepa derivada de la cepa I-2481 forma parte de la presente invención.

La cepa 16562, del serotipo 3, se aisló de un paciente afectado de Dengue en Manila en 1972. Se atenuó por 30 propagaciones sucesivas en células PGMK y se cultivó en células FRhL. La cepa vacunal 16562 PGMK 30 FRhL 3, objeto del depósito I-2482 efectuado en la CNCM y que es conveniente para los fines de la invención, se sometió a 3 propagaciones sucesivas en células FRhL después de las 30 propagaciones en células PGMK. Aunque esta cepa sea la preferida para la composición vacunal según la invención, es totalmente posible utilizar una cepa derivada de ella y principalmente una cepa que se haya sometido a algunas propagaciones adicionales en células PGMK o FRhL o una cepa que se haya cultivado posteriormente en células que la permitan conservar su carácter inmunógeno sin disminuir su carácter virulento. Así, podrían convenir igualmente las cepas que se hayan cultivado en células VERO. Se considera que cualquier cepa derivada de la cepa I-2482 forma parte de la presente invención.

La cepa 1036, del serotipo 4, se aisló de un niño afectado de Dengue clásico en Indonesia. Esta cepa se atenuó por propagaciones sucesivas en células PDK. La cepa 1036 PDK 48, que es conveniente para los fines de la invención y que es objeto del depósito I-2483 efectuado en la CNCM, se propagó 48 veces en células PDK.

Aunque esta cepa sea la preferida para la composición vacunal según la invención, es totalmente posible utilizar una cepa derivada de ella y principalmente una cepa que se haya sometido a algunas propagaciones adicionales en células PDK o una cepa que se haya cultivado posteriormente en células que la permitan conservar su carácter inmunógeno sin disminuir su carácter virulento. Así, podrían convenir igualmente las cepas que se hayan cultivado en células VERO. Se considera que cualquier cepa derivada de la cepa I-2483 forma parte de la presente invención.

Las cepas según la invención se utilizan para la preparación de composiciones vacunales. Estas composiciones vacunales pueden ser composiciones monovalentes, bivalentes, trivalentes o tetravalentes en el sentido en el que pueden comprender de 1 a 4 serotipos del virus del Dengue. Pueden comprender igualmente otros antígenos vacunales, lo que permite vacunar simultáneamente contra varias enfermedades.

En cada uno de estos casos, la cantidad de virus de cada uno de los serotipos se determina de manera que la dosis administrada induce una producción de anticuerpos neutralizantes frente al serotipo administrado, sin dar lugar sin embargo a reacciones secundarias indeseables. Se han obtenido buenos resultados gracias a vacunas monovalentes que contienen 10^3 pfu/ml cuando se trata del serotipo 4 y 10^3 a 10^4 pfu/ml cuando se trata de los demás serotipos.

Se han realizado igualmente ensayos con vacunas bivalentes obtenidas por mezcla simple de 0,5 ml de cada uno de los serotipos 1 y 2, o bien 1 y 4, o bien 2 y 4. Como se ha descrito en el artículo de Bhamarapravati y Yoksan (1989) "Study of bivalent vaccine in volunteers", Lancet, 1077, todas las composiciones vacunales se han revelado

inmunógenas y sin peligro, dando lugar a una tasa de seroconversión del 100% para cada una de las formulaciones ensayadas.

De la misma forma, una vacuna trivalente obtenida por mezcla de 0,33 ml de cada uno de los serotipos 1, 2 y 4 se ha ensayado igualmente en pacientes y ha dado lugar a una tasa de seroconversión del 100% como se ha descrito por Natth Bhamarapavati y SuteeYoksan en “*The clinical trial of trivalent Dengue vaccine*”, 1990, Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, Vol 21 (4) p. 709.

Se ha preparado igualmente una formulación tetravalente por mezcla de las formulaciones monovalentes y se ha obtenido una composición que ha dado lugar a una seroconversión del 100% de los sujetos vacunados.

Según un modo particular de la invención, la composición vacunal puede administrarse igualmente en 2 dosis, que pueden ser, bien dosis complementarias si se consideran los serotipos que contienen o bien dosis idénticas destinadas a administrarse 2 veces.

La inoculación de una vacuna monovalente o que contiene varios serotipos de Dengue a voluntarios previamente inmunes contra el Dengue no está acompañada de ninguna anomalía y principalmente de efectos secundarios indeseables como podría preverse cuando se refiere a la hipótesis de los anticuerpos facilitantes. Esta hipótesis elaborada por Halstead en los años 60 precisa que un factor de riesgo del Dengue hemorrágico era la aparición de un Dengue secundario en sujetos que presentan anticuerpos facilitantes obtenidos durante una primera infección. En otros términos, la aparición del Dengue hemorrágico parece deberse a 2 infecciones sucesivas por 2 serotipos diferentes del virus del Dengue. En las investigaciones realizadas con la vacuna, un determinado número de voluntarios estaban preinmunizados frente a un virus del Dengue. Después de la vacunación, no aparecieron efectos secundarios superiores en frecuencia y en intensidad comparativamente con sujetos seronegativos.

Además, se ha constatado que después de la administración de la 1ª dosis de una composición según la invención, la administración de una 2ª dosis se toleraba perfectamente bien y daba lugar en los sujetos que no habían tenido una respuesta frente a los 4 serotipos, a una complementación de la respuesta inmunitaria, es decir, a una respuesta de anticuerpos contra los serotipos frente a los que la respuesta era negativa durante la 1ª dosis.

Los ejemplos siguientes ilustran algunos modos particulares de realización de la presente invención.

Ejemplo 1

Ensayo clínico en 10 voluntarios con una vacuna monovalente contra el serotipo 2 del Dengue

Se dispone de la cepa 16681 PDK 53 obtenida por propagaciones sucesivas en las células PDK y preparada en albúmina humana a una concentración del 3,5%. La suspensión viral se centrifuga a 1.050 g durante 1 hora a 0-4°C. El sobrenadante se filtra mediante filtros 0,22 μ m y se reparte en ampollas de 1 ml que se almacenan a -80°C. La titulación viral de la vacuna candidata va de 2 a 5x10⁴ pfu/ml en células LLC-MK2. Los ensayos de control de calidad se realizaron según las monografías aplicables para las vacunas virales vivas atenuadas y se vio que eran satisfactorios.

Las dosis destinadas a administrarse por vía subcutánea, se preparan mezclando 2 dosis de 1 ml, siendo la mitad para la inmunización y la otra mitad para la determinación de la titulación viral.

La población objeto del ensayo está constituida por 10 adultos de sexo masculino que habitan en la provincia de Lampoon en Tailandia. Su edad está comprendida entre 18 y 30 años. Los exámenes clínicos, bioquímicos y hematológicos permiten concluir un buen estado de salud, con la excepción de algunos casos que presentan una infestación de parásitos intestinales con una eosinofilia baja a moderada. De los 10 voluntarios, 5 no presentan ningún signo serológico de una infección precedente con Dengue o Encefalitis japonesa, cuando los ensayos realizados son ensayos de neutralización y de reducción de halos de lisis (PRNT para Ensayos de Neutralización por Reducción del Halo de Lisis) o ensayos de inhibición de la hemaglutinación (HI para Inhibición de la Hemaglutinación). Los otros 5 voluntarios mostraron respuestas PRNT positivas al virus de la encefalitis japonesa (JEV para Virus de la Encefalitis Japonesa).

Después de la administración de la vacuna candidata, los voluntarios se examinan regularmente durante 21 días.

Se efectúan tomas de sangre en los días siguientes: J0, J6, J10, J14, J18, J21, J30, J60, J180, 1 año y 1 año 1/2 después de la inmunización. En las muestras sanguíneas recogidas, se efectúan ensayos de aislamiento del virus, dosificaciones serológicas, así como análisis bioquímicos y hematológicos.

Los resultados del ensayo son los siguientes.

Ninguno de los voluntarios presentó reacciones secundarias graves, tales como una temperatura elevada, hemorragias, hipotensión u otras. En la mitad de los voluntarios se observaron reacciones ligeras, tales como dolores de cabeza y dolores abdominales.

ES 2 315 221 T3

En lo que concierne a los análisis químicos, durante el estudio no se constató ninguna anormalidad.

Los análisis hematológicos mostraron que el número total de glóbulos blancos disminuyó en todos los voluntarios aproximadamente en J10 para volver a los valores normales en J14 o más tarde. Sin embargo, no apareció leucopenia verdadera. En el mismo momento, se pudo observar una linfocitosis, una monocitosis y una formación de linfocitos atípicos.

Por otra parte, en 6 de los 10 voluntarios, se observó la presencia de plaquetas gigantes sin trombocitopenia.

La titulación de la vacuna inoculada mostró que los voluntarios recibieron entre 1,9 y 2,7 10⁴ pfu/ml. Se constató una viremia en uno de los voluntarios en J10, después de amplificación en LLC-MK2 y C6/36. El virus detectado formaba halos de lisis pequeños y no se extendía a 37,9°C.

Las dosificaciones inmunológicas y principalmente los ensayos PRNT muestran que todos los voluntarios desarrollaron una respuesta de anticuerpos contra el serotipo 2 del Dengue. Los resultados se presentan en la tabla 5 siguiente.

Aunque no aparece en la tabla, se remarcó que determinados voluntarios desarrollaron igualmente una respuesta contra otros serotipos del Dengue; en los voluntarios que presentaban, antes del ensayo, anticuerpos contra la encefalitis japonesa, se observó una respuesta contra los 4 serotipos del Dengue, siendo sin embargo la respuesta contra el serotipo 2 la más importante.

TABLA 5

Número de Voluntario	Titulación de anticuerpos por PRNT después de la inmunización							
	0	J14	J21	J30	J60	J180	1 año	1 año 1/2
1	< 10	< 10	80	260	163	93	81	63
2	< 10	42	59	40	42	90	84	45
4	< 10	25	620	600	430	180	82	110
5	< 10	38	58	305	85	44	42	25
10	< 10	< 10	170	680	370	255	240	122
3	< 10	83	480	620	275	178	175	100
6	< 10	26	1.160	1.200	739	139	120	58
7	< 10	42	520	670	277	210	72	74
8	< 10	88	930	1.150	460	169	180	75
9	< 10	15	200	400	89	75	110	37

Los voluntarios 1, 2, 4, 5 y 10 (5 primeras líneas) son los 5 voluntarios que no presentan anticuerpos contra la encefalitis japonesa antes de la inoculación del presente ensayo, mientras que los voluntarios 3, 6, 7, 8 y 9 son los que no presentaban anticuerpos contra el Dengue pero que poseían anticuerpos contra la encefalitis japonesa.

Esta tabla pone de manifiesto el hecho de que la tasa de anticuerpos neutralizantes está en su máximo alrededor de J21-J30 y que estos anticuerpos persisten en el tiempo.

Ejemplo 2

Ensayo clínico con una vacuna monovalente contra el serotipo 1 del Dengue

Se dispone de la cepa 16007, aislada de un paciente, que se ha sometido a un determinado número de propagaciones en células PDK. Por lo tanto, se obtienen las cepas correspondientes con diferentes niveles de atenuación, que se administran por vía subcutánea a voluntarios Tailandeses, en forma de una dosis de 1 ml.

Los resultados obtenidos en términos de seroconversión 6 meses después de la fecha de inoculación se reúnen en la Tabla 6 siguiente:

En este ensayo, se considera que hay seroconversión cuando aparecen anticuerpos neutralizantes con una titulación superior a 1/10.

ES 2 315 221 T3

Número de Propagaciones en células PDK	Tasa de seroconversión (No de seroconversión/No de voluntarios)
PDK 43	17 (2/12)
PDK 30	40 (2/5)
PDK 20	60 (3/5)
PDK 13	78 (7/9)

Estos resultados muestran que la tasa de seroconversión es relativamente baja cuando las cepas se propagan de 20 a 43 veces en células PDK. En cambio, su reactogenicidad era igualmente baja, lo que es favorable. Si la cepa está muy atenuada ha perdido en parte su poder inmunógeno.

Después de 13 propagaciones, lo que corresponde a la cepa I-2480 objeto del depósito efectuado en la CNCM, la vacuna candidata presenta siempre una reactogenicidad mínima, pero en cambio la tasa de seroconversión después de la administración de una única dosis es el 78%.

Se administra una segunda dosis 1 mes después de la 1ª a 2 voluntarios que no se han seroconvertido con la cepa 16007 PDK 13; después de esta 2ª dosis, la tasa de seroconversión es el 100%.

Ejemplo 3

Ensayo clínico con una vacuna monovalente contra el serotipo 3 del Dengue

Se dispone de la cepa 16562 que se ha atenuado por 30 propagaciones en células PGMK y se cultivó por 3 propagaciones en células FRhL; esta cepa es objeto del depósito efectuado en la CNCM con el N° I-2482.

Administrada a 4 voluntarios, da lugar a un episodio de fiebre de 38,5°C en uno de ellos. Entre los voluntarios inmunizados, 3 se seroconvirtieron después de la 1ª dosis; el voluntario que no se seroconvirtió recibió una segunda dosis 1 mes después de la 1ª y se seroconvirtió igualmente.

Ejemplo 4

Ensayo clínico con una vacuna monovalente contra el serotipo 4 del Dengue

Se dispone de la cepa 1036 que se atenuó por 48 propagaciones sucesivas en células PDK. Esta cepa es objeto del depósito CNCM N° I-2483. Formulada en forma vacunal, se administra a 5 voluntarios y muestra una reactogenicidad mínima para una tasa de seroconversión del 100%.

Ejemplo 5

Ensayo clínico con vacunas bivalentes

A partir de vacunas monovalentes tales como las descritas en los ejemplos anteriores, se preparan vacunas bivalentes. Se preparan así dosis de 1 ml mezclando 0,5 ml de cada una de las vacunas monovalentes 1 y 2, 1 y 4, así como 2 y 4. Las vacunas obtenidas se administran a voluntarios de la misma forma que las vacunas monovalentes. Los resultados obtenidos son particularmente satisfactorios ya que las formulaciones vacunales son seguras y dan lugar a una seroconversión del 100 % de los sujetos inmunizados desde la 1ª inyección.

Ejemplo 6

Ensayo clínico con una vacuna trivalente

A partir de las vacunas monovalentes de los ejemplos 1, 2 y 4, se prepara una vacuna trivalente, en forma de dosis de 1 ml obtenida mezclando 0,33 ml de las vacunas monovalentes de los ejemplos anteriores. Administrada a voluntarios masculinos de 19 a 35 años, esta vacuna trivalente da lugar a una seroconversión de todos los sujetos inmunizados desde la 1ª inyección.

ES 2 315 221 T3

Ejemplo 7

Ensayo clínico con una vacuna tetravalente en una población de adultos

Se prepara una vacuna tetravalente a partir de las composiciones monovalentes de los ejemplos 1 a 4 anteriores.

La composición de la dosis vacunal se indica en la tabla 7 siguiente:

Serotipo	Volumen	Horquilla de concentración del virus (titulación media) *
Dengue 1	0,4ml	3.000-5.000 (4.000)
Dengue 2	0,1ml	800-1.200 (1.000)
Dengue 3	0,4ml	3.000-5.000 (4.000)
Dengue 4	0,1ml	3.000-5.000 (4.000)

* Resultados expresados en pfu/ml.

Esta composición se administró a 14 voluntarios, entre los que algunos tenían un estado inmunológico sin activar frente a los Flavivirus mientras que otros presentaban ya anticuerpos anti-Flavivirus antes de la administración de la vacuna candidata. Sin embargo, independientemente del estado inmunológico previo, todos los voluntarios se seroconvirtieron durante la administración de una única dosis de la vacuna candidata según la invención. Durante este ensayo, se observaron algunas reacciones secundarias ligeras en los sujetos vacunados.

Ejemplo 8

Ensayo clínico con una vacuna tetravalente en una población de niños

Se dispone de una composición vacunal tetravalente. La población objeto del ensayo es una población de niños que tienen de 1 a 14 años; está segmentada de la forma siguiente: niños entre 10 y 14 años, niños entre 5 y 9 años y niños entre 1 año y 4 años. Se utilizan diferentes dosis y diferentes formulaciones. Se inmunizan aproximadamente 169 niños. En el grupo de 5 a 9 años, con dosis que van de 4.000 a 6.000 pfu, se obtiene una tasa de seroconversión de casi el 80%. Se observan reacciones clínicas ligeras que consisten en fiebre (38°C) y erupción durante 1 a 2 días en aproximadamente el 1% de los inmunizados.

A 22 niños que recibieron una 1ª dosis de 1.350 pfu/ml, se les administra después de 6 meses una 2ª dosis que va de 1.300 a 3.000 pfu/ml y se obtiene una fuerte respuesta inmunitaria. Se observa en 20 sujetos la presencia de anticuerpos neutralizantes contra los 4 serotipos. Estos resultados confirman el interés de la administración de una segunda dosis.

REIVINDICACIONES

1. Cepa aislada atenuada del serotipo 1 del virus del Dengue, designada con la referencia 16007 PDK 13 y depositada en la CNCM con la referencia I-2480.

2. Cepa aislada atenuada del serotipo 2 del virus del Dengue, designada con la referencia 16881 PDK 53 y depositada en la CNCM con la referencia I-2481.

3. Cepa aislada atenuada del serotipo 3 del virus del Dengue, designada con la referencia 16562 PGMK 30-FrhL 3 y depositada en la CNCM con la referencia I-2482.

4. Cepa aislada atenuada del serotipo 4 del virus del Dengue, designada con la referencia 1036 PDK 48 y depositada en la CNCM con la referencia I-2483.

5. Composición vacunal que comprende al menos una cepa atenuada del virus del Dengue según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

6. Composición vacunal que comprende al menos una cepa atenuada del virus del Dengue derivada de una cepa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

7. Composición vacunal que comprende al menos una cepa de cada uno de los serotipos 1 a 4 del virus del Dengue, siendo las cepas las cepas atenuadas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o las cepas derivadas de éstas.

8. Composición vacunal según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, **caracterizada** porque está destinada a administrarse en 2 dosis.

9. Composición vacunal según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, **caracterizada** porque está destinada a administrarse por inyección subcutánea, en 2 dosis separadas por un intervalo de tiempo de al menos 1 mes.

10. Utilización de al menos una de las cepas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para la fabricación de una composición vacunal contra el Dengue.