



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

(21) PI0614265-6 A2



(22) Data de Depósito: 09/08/2006  
(43) Data da Publicação: 22/03/2011  
(RPI 2098)

(51) Int.CI.:  
A61K 39/12  
A61K 39/193

(54) Título: USO DE UMA VACINA DO VÍRUS DA  
FEBRE AMARELA E DE UMA VACINA DE  
FLAVIVÍRUS QUIMÉRICO E KIT CONTENDO  
REFERIDAS VACINAS

(30) Prioridade Unionista: 10/08/2005 US 60/707,038,  
22/09/2005 US 60/719,448

(73) Titular(es): Acambis, INC., Sanofi Pasteur SA

(72) Inventor(es): FARSHAD GUIRAKHOO, JEAN LANG,  
NIRANJAN KANESA-THASAN, RÉMI FORRAT, THOMAS H. ERMAK,  
THOMAS P. MONATH

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemsen, Bigler &  
Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2006030846 de 09/08/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/021672 de 22/02/2007

(57) Resumo: USO DE UMA VACINA DO VÍRUS DA FEBRE  
AMARELA E DE UMA VACINA DE FLAVIVÍRUS QUIMÉRICO E KIT  
CONTENDO REFERIDAS VACINAS. A presente invenção refere-se a  
métodos e kits para uso em vacinação contra infecção pelo vírus do  
dengue.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**USO DE UMA VACINA DO VÍRUS DA FEBRE AMARELA E DE UMA VACINA DE FLAVÍRUS QUIMÉRICO E KIT CONTENDO REFERIDAS VACINAS**".

Antecedentes da Invenção

5 A presente invenção refere-se à vacinação contra infecção pelo vírus do dengue.

O dengue, uma doença causada por quatro espécies distintas de vírus do dengue (chamados sorotipos 1-4), é a doença de origem em vetor mais importante da humanidade. Aproximadamente 100 milhões de pessoas 10 são infectadas pelos vírus do dengue anualmente em regiões tropicais e subtropicais do mundo (Halstead, "Epidemiology of Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever", CABI Publ., Nova York, pp. 23-44, 1997; Gubler, "Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever", CABI Publ., Nova York, PP. 1-22, 1997). Uma forma severa e potencialmente letal de doença causada por infecção do vírus do dengue, febre hemorrágica do dengue (DHF), está aumentando em distribuição e incidência geográficas. Esses fatos estimularam esforços intensivos para formular vacinas do dengue seguras e eficazes, mas, apesar de muitos esforços, se estendendo por mais de 50 anos, nenhuma vacina comercialmente disponível contra dengue foi desenvolvida. O 15 desenvolvimento de uma vacina contra dengue é então considerado ser uma alta prioridade pela Organização Mundial de Saúde (Chambers e outros, *Vaccine* 15:1494-1502, 1997).

A patogênese de DHF direciona a criação de vacinas do dengue. A DHF é uma doença imunopatológica, que acontece principalmente em indivíduos que tiveram uma infecção anterior com um sorotipo do dengue e então são expostos a um segundo sorotipo diferente (heterólogo). Infecção com qualquer um dos quatro sorotipos de dengue provê imunidade durável para aquele sorotipo homólogo, com base em anticorpos de neutralização. No entanto, imunidade para outros sorotipos do dengue heterólogos seguindo infecção com um sorotipo do dengue é de duração curta, se acontecer (Sabin, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1:30-50, 1952). Tipicamente, após algumas semanas ou meses, apenas anticorpos de ligação e não-neutralização para

sorotipos heterólogos estão presentes. Esses anticorpos de ligação mas não-neutralização podem acentuar infecção subsequente com um sorotípico do vírus do dengue heterólogo, aumentando o risco de doença severa (Rothman e outros, *Virology* 257:1-6, 1999).

5 Dada a imunopatogênese de DHF, uma vacina bem-sucedida contra dengue deve ser segura e induzir respostas de anticorpo de neutralização cruzada, de longa duração, contra todos os 4 sorotipos do vírus do dengue simultaneamente, de modo que títulos não caiam para níveis que poderiam deixar um indivíduo não-protégido contra infecção futura. Histori-  
10 camente, esforços empíricos em desenvolver candidatos à vacina atenuada, viva, demonstraram que é difícil atingir um equilíbrio entre atenuação suficiente (segurança) e imunogenicidade dos vírus de vacina candidata. Tem sido também difícil combinar cepas de vacina representando todos os quatro sorotipos em uma mistura tetravalente eficaz e um programa de dose múlti-  
15 pla foi necessário para atingir soroconversão contra todos os sorotipos, com o efeito indesejado de provisão de lacunas no programa de imunização onde os indivíduos poderiam ser sensibilizados para casos imunopatológicos. Na verdade, tentativas em imunizar com misturas de vacinas do dengue vivas, monovalentes, demonstraram interações significantes entre as quatro cepas  
20 de vírus e resultaram em efeitos de interferência viral (revisto em Saluzzo, *Adv. Virus Res.* 61:420-444, 2003).

Vacinas baseadas em flavivírus químérico geneticamente enge-  
nheirado contra vírus do dengue foram desenvolvidas, onde duas sequê-  
25 nças (isto é, sequências codificando as proteínas de pré-membrana (prM) e envelope (E)) de sorotípico do dengue 1, 2, 3 ou 4 são inseridas em um clone infeccioso de comprimento completo de vírus da febre amarela 17D, no lugar das sequências codificando as proteínas do vírus da febre amarela corres-  
pondentes (vide, por exemplo, Guirakhoo e outros, *J. Virol.* 75:7290-7304, 2001; Guirakhoo e outros, *Virology* 298:146-159, 2002). Esses vírus são al-  
30 tamente eficazes na indução de respostas imunes quando injetados em ma-  
cacos. No entanto, dados preliminares mostraram também alguns efeitos de interferência viral em seres humanos, que podem limitar a imunização contra

todos os quatro sorotipos após uma dose da vacina do dengue.

Os presentes inventores encontraram um método novo e seguro de imunização contra doenças do dengue, que permitem a indução de uma resposta de anticorpo de neutralização cruzada, de longa duração, contra 5 sorotipos 1-4 do dengue, enquanto evitando a necessidade de um programa de vacinação do dengue multidose e o risco potencial associado com uma resposta imune desequilibrada primária. O método da presente invenção, que usa um regime de imunização compreendendo a administração de uma primeira vacina de febre amarela seguido pela administração de uma vacina 10 do dengue baseada em flavivírus quimérico, permite a indução de uma resposta imune de neutralização cruzada contra vírus do dengue, que apresenta a vantagem de aparecer logo (dentro de 30 dias) após a administração da vacina do dengue, sendo de longa duração e sendo reativa cruzada contra 15 os quatro sorotipos. Ainda, o método da presente invenção apresenta o benefício adicional de indução de uma resposta imunoprotetora contra febre amarela.

Price e outros (*Am. J. Epid.* 88:392-397, 1968) descreveram anteriormente um método para imunização para flavivírus sequencial compreendendo uma série de três imunizações com vírus do dengue tipo 2 e dois 20 heterólogos (febre amarela e encefalite Japonesa). Ainda, diferente da presente invenção, a sequência de febre amarela seguido por dengue 2, sem a adição de imunização para JE, falhou em conferir imunidade protetora cruzada.

Scott e outros (*J. Infect. Dis.* 148:1055-1060, 1983) mostraram 25 que indivíduos que foram anteriormente imunizados com vacina da febre amarela e subsequentemente inoculados com uma do tipo 2 do dengue atenuada, viva, tinham respostas imunes realçadas ao tipo 2 do dengue, que eram também mais duráveis (durando 3 anos) do que em indivíduos sem imunidade para febre amarela anterior. A resposta realçada poderia ser de- 30 visto ao aumento (ligação, não-neutralização) de anticorpos elicitados para vírus do tipo 2 do dengue pela vacinação para febre amarela precedente (Eckels e outros, *J. Immunol.* 135(6):4201-4203, 1985). No entanto, Scott e

outros não mostraram que as vacinas para febre amarela seguidas pelas do dengue 2 elicitaram uma resposta imune de longa duração para os outros três sorotipos do dengue (tipo 1, 3 ou 4). Diferente da presente invenção, a sequência de febre amarela seguida por dengue tipo 2 não foi mostrada eliciar 5 uma resposta ampla pelo teste de neutralização, que é o único teste que prevê imunidade protetora.

Em um trabalho recente, Kanesa-thasan e outros (*Am. J. Trop. Med. Hyg.* 69 (Supl. 6):32-38, 2003) detectaram respostas heterólogas reforçadas e títulos de anticorpo antidengue em indivíduos remotamente vacinados 10 com YF seguindo vacinação com vacinas do dengue atenuadas. Essas respostas de anticorpo de curto prazo (até dia 30) foram demonstradas com ensaios de anticorpo incluindo neutralização, mas os autores concluíram que evidência para proteção contra infecção por dengue subsequente era inconclusiva. Diferente da presente invenção, os autores não puderam demonstrar 15 conclusivamente o momento ou administração anterior de vacinação para YF, respostas de anticorpo de neutralização amplas de longo prazo ou prover evidência para respostas de célula T reativa cruzada para dengue.

Os presentes inventores demonstraram pela primeira vez que indução de imunidade de neutralização cruzada contra sorotipos do dengue 20 múltiplos em humanos pode na verdade ser conferida através da administração sequencial de vírus químéricos da febre amarela e do dengue.

#### Sumário da Invenção

A presente invenção provê um método de indução de uma resposta imune de neutralização cruzada, de longa duração, para vírus do dengue 25 em um paciente compreendendo administrar ao paciente:

- (i) uma dose de uma vacina do vírus da febre amarela,
- (ii) uma dose de uma vacina de flavivírus químérico compreendendo pelo menos um flavivírus químérico compreendendo uma estrutura principal do vírus da febre amarela onde a sequência codificando proteína envelope 30 do vírus da febre amarela foi substituída com uma sequência codificando a proteína envelope de um vírus do dengue, onde a vacina de flavivírus químérico é administrada pelo menos 30 dias e até 10 anos

após administração da vacina da febre amarela. Em um exemplo, a sequência envelope do dengue é uma sequência embaralhada.

De acordo com uma modalidade, o flavivírus quimérico compreende uma estrutura principal de vírus da febre amarela onde as sequências 5 codificando as proteínas de membrana e envelope do vírus da febre amarela foram substituídas com sequências codificando as proteínas de membrana e envelope de um vírus do dengue. Em um exemplo, uma ou ambas dessas sequências do dengue são sequências embaralhadas.

De acordo com uma modalidade particular, a vacina de flavivírus 10 quimérico é administrada ao paciente 30, 60 ou 90 dias após administração da vacina da febre amarela.

De acordo com uma modalidade particular, o flavivírus quimérico usado na vacina do dengue da invenção é composto de uma estrutura principal do vírus da febre amarela 17D (YF17D).

15 De acordo com outra modalidade, a vacina do vírus da febre amarela usada no método da invenção compreende uma cepa YF17D.

De acordo com outra modalidade, a vacina de flavivírus quimérico usada no método da invenção compreende um flavivírus quimérico 20 compreendendo uma estrutura principal de vírus da febre amarela onde as sequências codificando as proteínas de membrana e envelope do vírus da febre amarela foram substituídas com sequências codificando as proteínas de membrana e envelope de um vírus do dengue sorotipo 1.

De acordo com outra modalidade, a vacina de flavivírus quimérico usada no método da invenção compreende um flavivírus quimérico 25 compreendendo uma estrutura principal de vírus da febre amarela onde as sequências codificando as proteínas de membrana e envelope do vírus da febre amarela foram substituídas com sequências codificando as proteínas de membrana e envelope de um vírus do dengue sorotipo 2.

De acordo com outra modalidade, a vacina de flavivírus quimérico 30 usada no método da invenção compreende um flavivírus quimérico compreendendo uma estrutura principal de vírus da febre amarela onde as sequências codificando as proteínas de membrana e envelope do vírus da fe-

bre amarela foram substituídas com sequências codificando as proteínas de membrana e envelope de um vírus do dengue sorotipo 3.

De acordo com outra modalidade, a vacina de flavivírus quimérico usada no método da invenção compreende um flavivírus quimérico compreendendo uma estrutura principal de vírus da febre amarela onde as sequências codificando as proteínas de membrana e envelope do vírus da febre amarela foram substituídas com sequências codificando as proteínas de membrana e envelope de um vírus do dengue sorotipo 4.

De acordo com uma modalidade particular, a vacina de flavivírus quimérico usada no método da invenção é uma vacina monovalente ou uma vacina tetravalente.

De acordo com outra modalidade, o método da invenção compreende ainda a administração de uma dose de reforço da vacina de flavivírus quimérico acima definida 6 meses a 10 anos após a primeira dose da vacina de flavivírus quimérico.

De acordo com outro aspecto, a presente invenção refere-se a um kit compreendendo:

(i) uma vacina do vírus da febre amarela, e  
(ii) uma vacina de flavivírus quimérico compreendendo pelo menos um flavivírus quimérico compreendendo uma estrutura do vírus da febre amarela onde a sequência codificando a proteína envelope do vírus da febre amarela foi substituída com a sequência codificando a proteína envelope de um vírus do dengue. Em um exemplo, a sequência envelope do dengue é uma sequência embaralhada.

De acordo com uma modalidade, o flavivírus quimérico compreende uma estrutura principal de vírus da febre amarela onde a sequência codificando as proteínas e membrana e envelope do vírus da febre amarela foi substituída com sequências codificando as proteínas de membrana e envelope de um vírus do dengue. Em um exemplo, ou uma ou ambas dessas sequências do dengue são sequências embaralhadas.

De acordo com uma modalidade do kit da presente invenção, a vacina do vírus da febre amarela compreende uma cepa de YF17D, onde

YF17D compreende várias subcepas usadas para vacinação contra febre amarela (incluindo 17D-204, 17D-213 e 17DD).

De acordo com outra modalidade, o flavivírus quimérico é composto de uma estrutura principal de vírus YF17D.

5 De acordo com outra modalidade do kit da invenção, a vacina de flavivírus quimérico compreende um flavivírus quimérico compreendendo uma estrutura principal de vírus YF17D onde a sequência codificando as proteínas de membrana e envelope do vírus da febre amarela foi substituída com sequências codificando as proteínas e membrana e envelope de um 10 vírus do dengue sorotipo 1.

De acordo com outra modalidade do kit da invenção, a vacina de flavivírus quimérico compreende um flavivírus quimérico compreendendo uma estrutura principal de vírus YF17D onde a sequência codificando as proteínas de membrana e envelope do vírus da febre amarela foi substituída 15 com sequências codificando as proteínas e membrana e envelope de um vírus do dengue sorotipo 2.

De acordo com outra modalidade do kit da invenção, a vacina de flavivírus quimérico compreende um flavivírus quimérico compreendendo uma estrutura principal de vírus YF17D onde a sequência codificando as 20 proteínas de membrana e envelope do vírus da febre amarela foi substituída com sequências codificando as proteínas e membrana e envelope de um vírus do dengue sorotipo 3.

De acordo com outra modalidade do kit da invenção, a vacina de flavivírus quimérico compreende um flavivírus quimérico compreendendo 25 uma estrutura principal de vírus YF17D onde a sequência codificando as proteínas de membrana e envelope do vírus da febre amarela foi substituída com sequências codificando as proteínas e membrana e envelope de um vírus do dengue sorotipo 4.

De acordo com outra modalidade o kit conforme definido acima 30 compreende ainda pelo menos uma dose de reforço de uma vacina de flavivírus quimérico conforme acima definido.

De acordo com outra modalidade, a invenção refere-se ao uso

dos vírus mencionados acima e em outro ponto aqui na prevenção e tratamento de infecção pelo vírus do dengue, bem como ao uso desses vírus na preparação de medicamentos para este propósito.

Definições

5 Por "resposta imune de neutralização cruzada" se quer dizer uma resposta imune específica compreendendo anticorpos de neutralização contra sorotipos do dengue diferentes múltiplos (até 4). Indução de uma resposta imune de neutralização cruzada pode ser facilmente determinada através de um ensaio de neutralização de redução de placa de referência (PRNT<sub>50</sub>). Por exemplo, indução de uma resposta imune de neutralização cruzada pode ser determinada através de um dos ensaios PRNT<sub>50</sub> conforme descrito no Exemplo 1. Uma amostra de soro é considerada ser positiva para a presença de anticorpos de neutralização cruzada quando o título do anticorpo de neutralização então determinado é pelo menos superior ou igual a 1:10 em pelo menos um desses ensaios.

10 Por "resposta imune de duração longa" se quer dizer uma resposta imune de neutralização cruzada positiva conforme acima definida que pode ser detectada em soro humano pelo menos 6 meses, vantajosamente, pelo menos 12 meses após a administração de uma vacina de flavivírus quimérico conforme definido abaixo.

15 Por "paciente" se quer dizer indivíduos *naïve* para febre amarela incluindo adultos e crianças.

20 Por indivíduos que "*naïve* para febre amarela" se quer dizer indivíduos sem nenhuma vacinação documentada contra febre amarela por mais de 10 anos e/ou nenhuma infecção por vírus da febre amarela certificada por mais de 10 anos.

25 Por "indivíduos imunes contra febre amarela" se quer dizer, dentro da estrutura da presente invenção, indivíduos com uma vacinação documentada contra febre amarela e/ou com uma infecção pelo vírus da febre amarela certificada que tenham acontecido 10 anos atrás ou menos, por exemplo, 5 anos ou menos, por exemplo, 4, 3, 2 ou 1 atrás, ou até mesmo 6, 5, 4, 3 ou 2 meses atrás e em alguns casos mais de 30 dias atrás.

- Por "flavivírus quimérico" se quer dizer um flavivírus quimérico composto de estrutura principal do vírus da febre amarela onde a sequência codificando a proteína envelope do vírus da febre amarela foi substituída com a sequência codificando a proteína envelope de um vírus do dengue.
- 5 Vantajosamente, um flavivírus quimérico é composto de uma estrutura principal do vírus da febre amarela onde as sequências codificando as proteínas de membrana e envelope do vírus da febre amarela foram substituídas com a sequência codificando as proteínas de membrana e envelope de um vírus do dengue. A estrutura principal da febre amarela pode ser vantajosamente
- 10 de uma cepa de vacina, tal como YF17D ou YF17DD. Esses flavivírus quiméricos são definidos em mais detalhes abaixo e são chamados YF/dengue-N, com N identificando o sorotipo do dengue.

- Por "vacina de flavivírus quimérico" se quer dizer uma composição imunogênica compreendendo uma quantidade imunoeficaz de pelo menos um flavivírus quimérico conforme acima definido e um excipiente farmacuticamente aceitável.

- A vacina de flavivírus quimérico é dita ser "monovalente" quando a vacina compreende um flavivírus quimérico expressando proteína(s) de um sorotipo do dengue. Exemplos de vacinas monovalentes são vacinas compreendendo YF/dengue-1, YF/dengue-2, YF/dengue-3 ou YF/dengue-, vantajosamente YF/dengue-2.

- A vacina de flavivírus quimérico é dita ser "bivalente" quando a vacina compreende flavivírus quimérico(s) expressando proteína(s) de dois sorotipos do dengue diferentes. Exemplos de vacinas bivalentes são vacinas compreendendo YF/dengue-2 e YF/dengue-4 ou YF/dengue-2 e YF/dengue-3 ou YF/dengue-2 e YF/dengue-1.

- A vacina de flavivírus quimérico é dita ser "trivalente" quando a vacina compreende flavivírus quimérico(s) expressando proteína(s) de três sorotipos do dengue diferentes. Exemplos de vacinas trivalentes são vacinas compreendendo YF/dengue-2, YF/dengue-1 e YF/dengue-4 ou YF/dengue-2, YF/dengue-3 e YF/dengue-4.

A vacina de flavivírus quimérico é dita ser "tetravalente" quando

a vacina compreende flavivírus quimérico(s) expressando proteínas de quatro sorotipos do dengue diferentes. Um exemplo de uma vacina tetravalente é uma vacina que inclui YF/dengue-1, YF/dengue-2, YF/dengue-3 e YF/dengue-4.

5 Por "quantidade imunoeficaz de um flavivírus quimérico" se quer dizer uma quantidade de flavivírus quimérico capaz de induzir, após administração em um indivíduo imune contra febre amarela, uma resposta imune de neutralização cruzada conforme acima definido. Tipicamente, uma quantidade imunoeficaz de um flavivírus quimérico é compreendida entre  $10^2$  e  $10^7$ ,  
10 por exemplo, entre  $10^3$  e  $10^6$ , tal como uma quantidade de  $10^4$ ,  $10^5$  ou  $10^6$ , unidades infecciosas (por exemplo, unidades de formação de plaqueta ou doses infecciosas de cultura de tecido) por sorotipo, por dose.

Uma vantagem central do método da presente invenção é a habilidade em induzir anticorpos de neutralização contra quatro sorotipos do dengue rápida e simultaneamente, deste modo protegendo contra febre do dengue e então evitando os riscos potenciais associados de desenvolver febre hemorrágica do dengue em exposição natural subsequente à infecção por dengue. Anticorpos de neutralização direcionados contra a proteína envelope do dengue são considerados o mediador principal de imunidade protetora contra infecção, deste modo, a demonstração de anticorpos de neutralização é considerada como um substituto relevante de uma imunidade de neutralização em pacientes.  
15  
20

Outras características e vantagens da invenção ficarão aparentes a partir da descrição detalhada, reivindicações e desenhos que seguem.

25 **Breve Descrição dos Desenhos**

A Figura 1 é um gráfico mostrando respostas de IFNy à vacina (estudo Dia 31 menos Dia 1). As duas doses de ChimeriVax®-Den2 deram respostas de célula T equivalentes. A resposta não foi inibida em indivíduos anteriormente vacinados com vacina do vírus da febre amarela.

30 **Descrição Detalhada**

A invenção provê um método para indução em um paciente de imunidade de neutralização cruzada, de longa duração, para todos os quatro

sorotipos do dengue (1-4) usando um procedimento de duas etapas, simples. A população-alvo é então composta especialmente dos pacientes sob risco de infecção por dengue que seguem: viajantes estrangeiros, expatriados e pessoal militar, bem como habitantes de regiões onde dengue é endêmica. Neste método, um paciente é primeiro imunizado com uma dose (de preferência uma dose, mas possivelmente mais de uma dose (por exemplo, 2 ou 3 doses)) de uma vacina do vírus da febre amarela (por exemplo, uma vacina atenuada viva, comercialmente disponível; vide abaixo). Após um intervalo de tempo apropriado de pelo menos 30 dias, que permite em particular quiescência da resposta imune inata induzida pela vacina do vírus da febre amarela, a segunda etapa do método é realizada, a qual envolve administração de uma dose de uma vacina de flavivírus quimérico compreendendo um ou mais vírus quiméricos atenuados, vivos, cada um compreendendo uma estrutura principal do vírus da febre amarela onde uma ou mais sequências codificando proteínas estruturais (por exemplo, proteínas de pré-membrana e envelope) foram substituídas com as sequências codificando as proteínas correspondentes de um vírus do dengue (por exemplo, dengue 1, 2, 3 ou 4). Os presentes inventores mostraram que esta sequência de imunização elicitava títulos de anticorpo de neutralização altos contra todos os quatro sorotipos do dengue. Esses anticorpos persistiram em níveis altos durante 6 meses e até mesmo 12 meses após a administração da vacina do dengue, indicando que imunidade contra dengue ampla é de longa duração. Uma vez que o agente de imunização inicial/agente iniciador (vacina da febre amarela) é incapaz de sensibilizar o indivíduo para DHF, não havia perigo de que a inoculação inicial, primeira, deixasse o indivíduo vulnerável a esta doença se a segunda injeção fosse retardada ou não dada. Esses resultados foram inesperados, uma vez que infecção sequencial com dois sorotipos do vírus do dengue, que são muito mais intimamente relacionados um com o outro com base na sequência de genoma e relações antigênicas do que a febre amarela está relacionada com o dengue, não induz proteção sólida ou respostas de anticorpo de neutralização cruzada amplas contra infecção com os dois sorotipos do dengue restantes. Demonstração adicio-

nal da natureza inesperada do método de vacinação sequencial da invenção foi provida através de um exame da resposta de anticorpo de febre amarela seguindo a segunda etapa (inoculação do vírus do dengue quimérico). O método da invenção é descrito mais, como segue.

5 Vacinas do Vírus da Febre Amarela

Conforme é mencionado acima, a primeira etapa do método da invenção envolve administração ao paciente de uma dose de uma vacina do vírus da febre amarela. Exemplos de tais vacinas que podem ser usadas na invenção incluem vacinas atenuadas, vivas, tal como aquelas derivadas da cepa YF17D, que foi originalmente obtida através da atenuação da cepa A-sibi do tipo selvagem (Smithburn e outros, "Yellow Fever Vaccination", World Health Organization, p. 238, 1956; Freestone, em Plotkin e outros (Eds.), *Vaccines*, 2<sup>a</sup> edição, W.B. Saunders, Filadélfia, E.U.A., 1995). Um exemplo de uma cepa YF17D a partir da qual vacinas que podem ser usadas na invenção podem ser derivadas é YF17D-204 (YF-VAX®, Sanofi-Pasteur, Swiftwater, PA, USA; Stamaril®, Sanofi-Pasteur, Marcy-L'Etoile, França; A-RILVAX®, Chiron, Speke, Liverpool, UK; FLAMIVUN®, Berna Biotech, Bern, Suíça/ YF17D-204 França (X15067, X15062); YF17D-204, 234 US (Rice e outros, *Science* 229:726-733, 1985)), enquanto outros exemplos de tais cepas que podem ser usados são a cepa intimamente relacionada YF17DD (No. de Acesso no GenBank U17066), cepas YF17D-213 (No. de Acesso no GenBank U17067) e vírus da febre amarela 17DD descritas por Galler e outros, *Vaccines* 16(9/10):1024:1028, 1998. Em adição a essas cepas, quaisquer outras cepas de vacina do vírus da febre amarela verificadas ser aceitavelmente atenuadas em humanos, tal como pacientes humanos, podem ser usadas na invenção.

As vacinas do vírus da febre amarela usadas na invenção podem ser obtidas de fontes comerciais (vide acima) ou podem ser preparadas usando métodos que são bem conhecidos na técnica. Em um exemplo de tais métodos, embriões de galinha são inoculados com vírus em um nível de passagem fixo, e então vírus isolado de sobrenadantes de homogenatos centrifugados é seco com congelamento. Em outros métodos, a cepa da fe-

bre amarela é cultivada em fibroblastos de embrião de galinha culturados (vide, por exemplo, Freire e outros, *Vaccine* 23(19):2501-2512, 2005) ou outras células culturadas para fabricação de vacinas virais tal como células Vero. As vacinas do vírus da febre amarela são geralmente armazenadas 5 em forma liofilizada antes do uso. Quando necessárias para administração, as vacinas são reconstituídas em uma solução aquosa (tipicamente, cerca de 0,5 mL), tal como solução de cloreto de sódio a 0,4%, e então são administradas através de injeção subcutânea em, por exemplo, músculo deltóide. Outros modos de administração determinados como sendo apropriados por 10 aqueles de habilidade na técnica (por exemplo, injeção intramuscular ou intradermal ou administração percutânea usando métodos que aplicam vírus às camadas superficiais da pele) podem ser também usados. A vacina pode ser administrada em dosagens variando de a partir de, por exemplo, 2-5 (por exemplo, 3 ou 4)  $\log_{10}$  unidades de formação de placa (PFU) por dose. Todas as vacinas comercializadas são usadas de acordo com as recomendações 15 do fabricante. Em uma modalidade, a primeira etapa do método da invenção consiste na administração de uma dose de Stamaril® ou de uma dose de YF-VAX®.

O método da presente invenção pode ser também adaptado para 20 ser usado com pacientes imunes contra febre amarela. Em tal caso, o método apenas compreende a segunda etapa envolvendo a administração de uma dose de uma vacina de flavivírus quimérico conforme definido abaixo. O dito método está também incluído no escopo da presente invenção.

#### Vacina de Flavivírus Quimérico

25 A segunda etapa do método de imunização de acordo com a invenção compreende administração de uma dose de uma vacina de flavivírus quimérico conforme acima definido. Por questão de clareza, na descrição que segue, a invenção é apenas definida em relação ao uso de flavivírus quiméricos onde o flavivírus quimérico é composto de uma estrutura principal de vírus da febre amarela onde as sequências codificando as proteínas de membrana e envelope do vírus da febre amarela foram substituídas com 30 as sequências codificando as proteínas de membrana e envelope de um ví-

rus do dengue. A invenção também inclui o uso de outras quimeras, tal como quimeras onde apenas uma proteína (por exemplo, a proteína envelope) de uma cepa da vacina para febre amarela foi substituída, ou quimeras onde todas as três proteínas estruturais foram substituídas.

5 Vírus quiméricos que podem ser usados na presente invenção incluem aqueles baseados na cepa da vacina da febre amarela humana, YF17D (por exemplo, TF17D-204, UF17D-213 ou YF17DD), conforme acima descrito. Nesses vírus, a proteínas de pré-membrana e envelope do vírus da febre amarela são substituídas com proteínas de pré-membrana e envelope 10 de um vírus do dengue (sorotipo 1, 2, 3 ou 4). Em uma modalidade da presente invenção, os vírus quiméricos são compostos de uma estrutura principal de YF17D-204 onde as sequências codificando proteínas de pré-membrana e envelope do vírus da febre amarela são substituídas com a sequência codificando as proteínas de pré-membrana e envelope de sorotipo 15 1, 2, 3 e/ou 4 do dengue do tipo selvagem, por exemplo, com as sequências codificando as proteína de pré-membrana e envelope do vírus do dengue 1 PUO-359, vírus do dengue 2 PUO-218, vírus do dengue 3 PaH-881/88 ou vírus do dengue 4 1228. Detalhes da construção desses construtos de vírus químérico e relacionados são providos, por exemplo, nas publicações que 20 seguem: WO 98/37911; WO 01/39802; Chambers e outros, *J. Virol.* 73:3095-3101, 1999; WO 03/103571/ WO 2004/045529; Patente U.S. Nº 6.695.281; Patente U.S. Nº 6.184.024; Patente U.S. Nº 6.675.936; Patente U.S. Nº 6.497.884; Guirakhoo e outros, *J. Virology* 75:7290-7304, 2001; Guirakhoo e outros, *Virology* 298:146-159, 2002; e Caufour e outros, *Virus Res.* 79(1-25 2):1-14, 2001. Como um exemplo específico de um flavivírus químérico que pode ser usado na invenção, foi feita uma lista dos flavivírus quiméricos que seguem, que foram depositados com a *American Type Culture Collection* (ATCC) em Manassas, Virginia, E.U.A. sob os termos do Tratado de Budapeste e concedida uma data de depósito de 6 de janeiro de 1998: Chimeric 30 Yellow Fever 17D/Dengue Type 2 Virus (YF/DEN-2; Número de acesso ATCC ATCC VR-2593).

Os flavivírus quiméricos usados nos métodos da invenção po-

dem, opcionalmente, incluir mutações de atenuação em sequências do vírus do dengue. Por exemplo, as sequências do dengue podem incluir uma deleção ou substituição de aminoácido envelope 204 (sorotipos do dengue 1, 2 e 4) ou 202 (sorotipo do dengue 3), que é lisina no vírus do tipo selvagem. Em 5 um exemplo de tal substituição, a lisina nesta posição é substituída com arginina. Em outros exemplos, um ou mais outros aminoácidos na região de aminoácidos 200-208 (ou combinações desses aminoácidos) são mutados, com exemplos específicos incluindo o que segue: posição 202 (K) de dengue-1; posição 202 (E) de dengue-2; posição 200 de dengue-3 (K); e posição 10 200 (K), 202 (K) e 203 (K) de dengue-4. Esses resíduos podem ser substituídos com, por exemplo, arginina. Essas mutações são descritas em detalhes no WO 03/103571, cujo conteúdo é aqui incorporado a título de referência.

Em adição às quimeras descritas acima, outras quimeras que 15 contêm proteínas estruturais incluindo epítopos de mais de um sorotipo do vírus do dengue (2, 3 ou 4) podem ser usadas na invenção. Em um exemplo, quimeras podem ser feitas usando tecnologia de embaralhamento, que envolve ciclos de fragmentação, reunião e seleção de sequências que estão sendo embaralhadas (vide, por exemplo, Locher e outros, *DNA Cell Biol.* 20 24(4):256-263, 2005). Deste modo, no presente caso, sequências codificando proteínas envelope e de pré-membrana de um subconjunto desejado de sorotipos do dengue (ou todos os sorotipos do dengue) podem ser processadas deste modo para gerar sequências de envelope e/ou pré-membrana embaralhadas, que são então usadas para substituir as sequências correspondentes de estrutura principal do vírus da febre amarela conforme aqui descrito (por exemplo, UF17D). Tal embaralhamento quimérico YF/Den1-4 25 (supondo sequências embaralhadas incluindo epítopos de todos os quatro sorotipos) pode ser produzido através de, por exemplo, transfecção de células Vero com transcritos de DNA quiméricos e recuperação de vírus vivo a partir do sobrenadante conforme descrito anteriormente (Guirakhoo e outros, *J. Virol.* 75(16):7290-7304, 2001) e mencionado em um outro ponto aqui. 30 Essas quimeras embaralhadas podem ser usadas na invenção em regimes

de vacinação envolvendo administração das quimeras embaralhadas seguindo vacinação contra febre amarela (por exemplo, YF17D), ou em qualquer um dos métodos de combinação descritos em outro ponto aqui.

Os vírus quiméricos descritos acima podem ser feitos usando 5 métodos-padrão na técnica. Por exemplo, uma molécula de RNA correspondendo ao genoma de um vírus pode ser introduzida em células primárias, embriões de galinha ou linhagens de célula diploide, dos quais vírus da progênie (ou cujos sobrenadantes) podem ser então purificados. Outros métodos que podem ser usados para produzir os vírus empregam células heteroploidies, tal como células Vero (Yasumura e outros, *Nihon Rinsho* 21:1201-1215, 1963). Em um exemplo de tais métodos, uma molécula de ácido nucléico (por exemplo, uma molécula de RNA) correspondendo ao genoma de um vírus é introduzida nas células heteroploidies, vírus é coletado do meio onde as células foram culturadas, o vírus coletado é tratado com uma nuclease (por exemplo, uma endonuclease que degrada ambos DNA e RNA, tal como Benzonase®; Patente U.S. Nº 5.173.418), o vírus tratado com nuclease é concentrado (por exemplo, através do uso de ultrafiltragem usando um filtro tendo um corte de peso molecular de, por exemplo, 500 kDa), e o vírus concentrado é formulado para os propósitos de vacinação. Detalhes deste 10 15 20 método são providos no WO 03/060088 A2, que é aqui incorporado a título de referência. Ainda, métodos para produção de vírus quiméricos são descritos nos documentos citados acima em referência à construção de construtos de vírus químérico.

25 Formulação dos vírus quiméricos usados nos métodos da invenção pode ser realizada usando métodos que são padrão na técnica. Várias soluções farmaceuticamente aceitáveis para uso em preparação de vacina são bem conhecidas e podem ser prontamente adaptadas para uso na presente invenção por aqueles de habilidade na técnica (vide, por exemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences* (18ª edição), Ed. A. Gennaro, 1990, 30 Mack Publishing Co., Easton, PA). Em dois exemplos específicos, os vírus são formulados em *Minimum Essential Medium Earle's Salt* (MEME) contendo 7,5% de lactose e 2,5% de albumina de soro humano ou MEME contendo

10% de sorbitol. No entanto, os flavivírus químéricos podem ser simplesmente diluídos em uma solução fisiologicamente aceitável, tal como solução salina estéril ou solução salina tamponada estéril. Em outro exemplo, os vírus podem ser administrados e formulados, por exemplo, da mesma maneira que a vacina da febre amarela 17D, por exemplo, como uma suspensão clássica de tecido de embrião de galinha infectado ou um fluido coletado de culturas de célula infectadas com um vírus químérico.

5 As vacinas de flavivírus químéricos da invenção são clássicamente armazenadas ou na forma de uma composição líquida congelada ou 10 na forma de um produto liofilizado. Para este propósito, o flavivírus químérico pode ser misturado com um diluente clássicamente uma solução aquosa tamponada compreendendo compostos crioprotetores tal como álcool de açúcar e estabilizador. Antes do uso, o produto liofilizado é misturado com 15 um diluente ou excipiente farmaceuticamente aceitável tal como uma solução de NaCl a 4% estéril para reconstituir uma vacina de flavivírus químérico injetável líquida.

No método da invenção, a vacina de flavivírus químérico pode ser uma vacina monovalente, uma bivalente, uma trivalente ou uma tetravalente.

20 De acordo com uma modalidade, a vacina de flavivírus químérico é uma vacina monovalente onde o vírus químérico é composto de uma estrutura principal de YF17D-204 onde a sequência codificando proteínas de pré-membrana e envelope do vírus da febre amarela é substituída com as sequências codificando as proteínas de pré-membrana e envelope do vírus 25 do dengue 2 PUO-218.

De acordo com outra modalidade, a vacina de flavivírus químérico é uma vacina tetravalente, isto é, uma vacina compreendendo vírus químéricos(s) expressando antígeno(s) dos 4 sorotipos do vírus do dengue (1 a 30 4). Em uma modalidade particular, esta vacina tetravalente inclui vantajosamente quatro flavivírus químéricos compostos respectivamente de uma estrutura principal de YF17D-204 onde as sequências codificando proteínas de pré-membrana e envelope do vírus da febre amarela são substituídas com

sequências codificando as proteínas de pré-membrana e envelope do vírus do dengue 1 PUO-359 (YF/dengue1), vírus do dengue 2 PUO-218 (UF/dengue2), vírus do dengue 3 PaH-881/88 (YF/dengue3) ou vírus do dengue 4 1228 (YF/dengue4). Esta vacina tetravalente específica é chama-  
5 da no Exemplo 2 abaixo ChimeriVax®-DEN tetravalente.

Exemplos de vacinas de flavivírus quiméricos tetravalentes a-  
propriados para serem usados no método da invenção são também descri-  
tos em detalhes no WO 03/101397, cujo conteúdo é aqui incorporado a título  
de referência. Vacinas multivalentes podem ser obtidas através da combina-  
10 ção de vacinas do dengue monovalentes individuais.

Os vírus quiméricos da invenção podem ser administrados usando métodos que são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, os vírus podem ser formulados como soluções aquosas estéreis contendo entre  $10^2$  e  $10^7$ , por exemplo, contendo entre  $10^3$  e  $10^6$ , tal como  $10^4$ ,  $10^5$   
15 ou  $10^6$  unidades infecciosas (por exemplo, unidades de formação de placa ou doses infecciosas de cultura de tecido) por sorotipo em um volume de dose de 0,1 a 1,0 mL, a serem administradas através de, por exemplo, via subcutânea, intramuscular ou intradermal. Em uma modalidade, a vacina de flavivírus quimérico é uma vacina monovalente, bivalente, trivalente ou  
20 tetravalente compreendendo vantajosamente  $10^5$  pfu por sorotipo, por dose e é administrada subcutaneamente. Ainda, devido ao fato de que os flavivírus podem ser capazes de infectar o hospedeiro humano *via* vias mucosais, tal como a via oral (Gresikova e outros, "Tick-borne Encephalitis", Em *The Arboviruses, Ecology and Epidemiology*, Monath (Ed.), CRC  
25 Press, Boca Raton, Flórida, 1988, Volume IV, 177-203), uma administração através de vias mucosais (por exemplo, oral) poderia ser também com-  
preendida.

Opcionalmente, adjuvantes que são conhecidos daqueles versa-  
dos na técnica podem ser usados na administração dos vírus usados na in-  
30 venção. Adjuvantes que podem ser usados para realçar a imunogenicidade dos flavivírus quiméricos incluem, por exemplo, agonistas e antagonistas de receptor tipo *toll* (TLRs).

### Métodos de Imunização

Como acima mencionado, a invenção geralmente envolve administração de uma cepa de vacina da febre amarela (por exemplo, uma cepa YF17D, como é acima mencionado), seguido pela administração de um ou 5 mais flavivírus químéricos, em cada um dos quais as proteínas de pré-membrana ou envelope do vírus da febre amarela foram substituídas com as proteínas correspondentes de um vírus do dengue (sorotipo 1, 2, 3 ou 4). A vacina do vírus da febre amarela é administrada usando métodos-padrão (por exemplo, através de injeção subcutânea, intramuscular ou intradermal, 10 ou através de administração percutânea empregando um dispositivo que aplica o vírus à pele superficial), em quantidades variando de a partir de, por exemplo, 2-5 (por exemplo 3 ou 4)  $\log_{10}$  unidades de formação de placa (PFU) por dose, que tipicamente está em um volume de cerca de 0,5 mL para injeção subcutânea, 0,1 mL para injeção intradermal ou 0,002-0,02 mL 15 para administração percutânea.

Para permitir um tempo suficiente para quiescência da resposta imune inata induzida pela vacina da febre amarela, a vacina de flavivírus químérico é administrada pelo menos entre 30 dias e 10 anos, em particular entre 30 dias e 5 anos, tal como entre 30 dias e 1 a 3 anos, vantajosamente, 20 30, 60 ou 90 dias, após a vacina da febre amarela, usando métodos-padrão e em quantidades variando de a partir de  $10^2$  e  $10^7$ , por exemplo, de a partir de  $10^3$  e  $10^6$ , tal como  $10^4$ ,  $10^5$  ou  $10^6$  unidades infecciosas (expressas como pfu ou doses de infecção de cultura de tecido) por sorotipo por dose. Ainda, no caso de administração de formulações bi-, tri- ou tetravalentes (vide abaixo), em geral, as quantidades de cada quimera em tal vacina são equivalentes, embora uso de quantidades diferentes de cada quimera esteja também incluído na invenção.

Os métodos da invenção podem então envolver, por exemplo, administração de uma vacina do vírus da febre amarela no Dia 0 e administração 30 de uma quimera YF/dengue-1, YF/dengue-2, YF/dengue-3, e/ou YF/dengue-4 no Dia 30 (ou em um momento posterior, conforme acima mencionado). A quimera pode ser administrada como uma vacina monova-

lente (isto é, uma vacina incluindo apenas um dos vírus quiméricos que se-  
guem: YF/dengue-1, YF/dengue-2, YF/dengue-3 e/ou YF/dengue-4, uma  
formulação bivalente (por exemplo, uma vacina incluindo duas das quimeras  
listadas acima, por exemplo, incluindo vantajosamente YF/dengue-2 e

5 YF/dengue-4 ou YF/dengue-2 e YF/dengue-3 ou YF/dengue-2 e YF/dengue-  
1), uma vacina trivalente (por exemplo, uma vacina incluindo três das quime-  
ras listadas acima, vantajosamente, uma vacina compreendendo  
YF/dengue-2, YF/dengue-1 e YF/dengue-4 ou YF/dengue-2, YF/dengue-3 e  
YF/dengue-4) ou uma vacina tetravalente.

10 O método da invenção leva a uma soroconversão (isto é, indu-  
ção de uma resposta imune neutralizante) para quatro sorotipos do dengue  
após apenas uma dose da vacina de flavivírus quimérico. Embora doses a-  
dicionais da vacina de flavivírus quiméricos não sejam necessárias para a-  
tingir a soroconversão e resposta imune neutralizante cruzada, de longa du-  
ração, administração de doses de reforço da vacina de flavivírus quimérico é  
15 compreendida na presente invenção. A(s) dose(s) de reforço da vacina qui-  
mérica da invenção pode(m) ser necessária(s) para sustentar a resposta  
imune de neutralização cruzada por um período de tempo mais longo e po-  
de(m) ser administrada(s) entre 6 meses e 5 a 10 anos após a primeira dose  
20 da vacina do dengue quimérica, por exemplo, 6 meses, 1 ano, 2 anos, 3 a-  
nos, 4 anos ou 5 anos, ou até mesmo 10 anos após a primeira dose da vaci-  
na de flavivírus quimérico. A vacina de flavivírus quimérico de reforço pode  
ser diferente da ou vantajosamente idêntica à primeira vacina de flavivírus  
25 quimérico administrada. A descrição dada acima em relação à vacina de fla-  
vivírus quimérico a ser administrada no método da invenção aplica *mutatis*  
*mutandis* ao reforço da vacina de flavivírus quimérico. O reforço pode então  
ser uma vacina monovalente, bivalente, trivalente ou tetravalente, com rela-  
ção aos sorotipos do dengue presentes na vacina. Deste modo, um exemplo  
30 de um método da invenção pode envolver administração de uma dose de  
uma vacina para febre amarela, seguido por uma dose de uma vacina de  
flavivírus quimérico monovalente (dengue 1, 2, 3 ou 4, vantajosamente, den-  
gue 2), que é então seguida pela administração de (i) uma vacina de flavivi-

rus quimérico monovalente do mesmo sorotipo ou um diferente que a quimera inicialmente administrada (vantajosamente do sorotipo 4), (ii) uma vacina de flavivírus quimérico bivalente, que pode ou não incluir o mesmo sorotipo que a quimera inicial (por exemplo, vantajosamente dengue 1 e 2 seguido

5 por dengue 3 e 4), (iii) uma vacina de flavivírus quimérico trivalente, que pode ou não incluir o mesmo sorotipo que a quimera inicial ou (iv) uma vacina de flavivírus quimérico tetravalente. A vacina de flavivírus quimérico de reforço é vantajosamente idêntica à primeira vacina de flavivírus quimérico com relação à sua composição antigênica.

10 A invenção então refere-se também a uma composição para indução em um paciente de uma resposta imune de neutralização cruzada, de longa duração, ao vírus do dengue incluindo (i) uma vacina do vírus da febre amarela e (ii) uma vacina de flavivírus quimérico para uma administração sequencial, onde a vacina da febre amarela químérica é administrada pelo 15 menos 30 dias e até 10 anos após administração da vacina do vírus da febre amarela.

20 A invenção também inclui kits que incluem uma vacina do vírus da febre amarela e/ou uma ou mais vacina(s) de flavivírus quimérico, conforme aqui descrito. Os kits da invenção podem também incluir instruções para uso dos kits nos métodos de vacinação descritos aqui. Essas instruções podem incluir, por exemplo, indicações de quais quantidades de vacina administrar e/ou informação de quando as vacinas devem ser administradas.

25 Todas as publicações e pedidos de patente citados neste relatório são aqui incorporados a título de referência como se cada publicação ou pedido de patente individual fosse especificamente e individualmente indicado estar incorporado a título de referência.

A invenção é baseada, em parte, nos resultados experimentais descritos nos Exemplos que seguem.

### EXEMPLOS

30 Nos Exemplos mostrados abaixo, experimentos e estudos clínicos são descritos, os quais mostram os efeitos de imunidade anterior ao vírus da febre amarela sobre vacinação subsequente com uma vacina

YF/dengue-2 quimérica (Exemplo 1) ou uma vacina tetravalente (YF/dengue-1, YF/dengue-2, YF-dengue-3 e YF/dengue-4) (Exemplo 2). Esses estudos incluem análise de anticorpos de neutralização, soroconversão, viremia e respostas de célula T.

5 **Exemplo 1:** ChimeriVax®-Den2

Vacina comercial YF17D (YF-VAX®) foi comprada da Aventis-Pasteur, Swiftwater, PA. ChimeriVax®-DEN2 é uma vírus geneticamente engenheirado, atenuado, vivo, onde as sequências codificando duas proteínas estruturais (prM e E) ou vírus da vacina YF17D são substituídos com as sequências correspondentes do vírus DEN2 (cepa PUO-218 isolada de um caso de febre do dengue clássico, Bangkok, Tailândia). A construção genética de um genoma viral quimérico é realizada usando ácido desoxirribonucleico clonado circular (cDNA). cDNA de comprimento completo é transcrito para ácido ribonucléico (RNA) e o RNA usado para transfectar culturas de célula, que produzem vírus vivo (Guirakhoo e outros, *J. Virol.* 75:7290-7304, 2001).

O vírus da vacina foi produzido de acordo com a *Good Manufacturing Practice* (cGMP) atual. O vírus cresce em células Vero (rim de macaco verde Africano) de bancos de célula que foram testados quanto a agentes 20 accidentais, de acordo com as orientações da *Food and Drug Administration* (FDA) para produtos derivados da cultura de célula de mamífero. Fluido sobrenadante de culturas de célula Vero contendo vírus de vacina é coletado, clarificado de restos celulares através de filtragem e tratado com uma nuclease (Benzonase®) para digerir moléculas de ácido nucléico derivadas de célula hospedeiro. O vírus bruto tratado com nuclease é então concentrado 25 através de filtragem e purificado através de diafiltragem. A vacina é formulada com Albumina de Soro Humano (HSA) USP (2,5%) e lactose USP (7,5%). A vacina foi mostrada ser estéril e livre de micoplasma, retrovírus [da Product Enhanced Reverse Transcriptase (PERT)] e vírus accidentais através de 30 testes *in vitro* e *in vivo*. O frasco final de vacina foi testado quanto à esterilidade, potência, identidade, pH, aparência, osmolaridade, HSA, lactose, endotoxina, segurança (segurança geral modificada em camundongos e por-

quinhos-da-índia) e neurovirulência de camundongo.

Estudos pré-clínicos em macacos mostraram que ChimeriVax®-DEN2 é altamente imunogênica e bem tolerada após inoculação de doses variando de a partir de 2 a 5  $\log_{10}$  PFU (Guirakhoo e outros, *J. Virol.* 5 74(12):5477-5485, 2000). Uma viremia de grau baixo aconteceu durante a primeira semana após vacinação em macacos, similar àquela induzida pela vacina da febre amarela 17D. Uma injeção subcutânea única de vacina 2  $\log_{10}$  PFU (a dose mínima testada) induziu anticorpos de neutralização após 15-30 dias, que protegeu contra provação com vírus DEN2 do tipo selvagem.

#### Estudo Clínico com Vacina ChimericVax®-DEN2 Monovalente

Um estudo de paciente ambulatorial de centro único, duplo-cego, aleatorizado, foi realizado. Após avaliação, indivíduos *naïve* para febre amarela (YF) qualificados foram aleatorizados para uma vacinação única com dose baixa ou alta de ChimeriVax®-DEN2 (3,0 ou 5,0  $\log_{10}$  de unidades de formação de placa) ou YF-VAX®. Havia também um componente aberto onde resposta de anticorpo à vacinação com ChimeriVax®-DEN de dose alta foi avaliada em indivíduos imunes com YF. Os indivíduos foram acompanhados nos Dias 1-11, 21 e 31 quanto à resposta de anticorpo e avaliações de segurança, e a durabilidade de resposta de anticorpo foi avaliada em 6 e 12 meses pós-vacinação.

Após avaliação, 42 indivíduos *naïve* para YF qualificados foram aleatorizados igualmente em 3 grupos (dose alta ou baixa de ChimeriVax®-DEN2 ou YF-VAX®). No dia, 1, 14 indivíduos receberam uma vacinação subcutânea única (SC) com ChimeriVax®-DEN2 (dose alta ou baixa) ou YF-VAX®. 14 indivíduos adicionais que eram imunes para YF (da vacina para YF feita 6 meses a 5 anos antes da administração da vacina do dengue quimérica) receberam alta dose de ChimeriVax®-DEN2. Os indivíduos retornaram para a clínica nos Dias 2-11, 21 e 31. Avaliações de segurança foram realizadas em pontos de tempo especificados durante os Dias 1-31. Respostas de anticorpo a cepas de vacina homólogas e cepas do tipo selvagem de DEN2, e anticorpos de neutralização para YF17D e cepas protótipo de DEN-

14, foram medidas nos Dias 1 (pré-vacinação) e 31. O estudo era não-cego após o término do período de tratamento, e os indivíduos foram avaliados em 6 e 12 meses pós-vacinação quanto à durabilidade da resposta de anticorpo.

5 A proporção de indivíduos que desenvolveram anticorpos de neutralização em um nível  $\geq 1:10$  a cepas diferentes representando os quatro sorotipos do dengue foi determinada. O efeito de imunização anterior com YF sobre a taxa de soroconversão de DEN2 nos grupos YF-imune e YF-naïve recebendo dose alta de ChimeriVax<sup>®</sup>-DEN2 foi analisado. Os títulos de 10 anticorpo de neutralização médios geométricos em cada grupo de tratamento e para todos os quatro sorotipos do dengue foram medidos em vários intervalos de tempo após vacinação, até 12 meses.

#### Viremia

15 Circulação de vírus no corpo (viremia) é uma medida de replicação das vacinas atenuadas, vivas, usadas no estudo. A viremia foi ensaiada através de um ensaio em placa in células Vero. O número de indivíduos que desenvolveram viremia nos 11 dias após vacinação é mostrado pelo dia de visita na Tabela 1. Mais indivíduos YF-naïve vacinados com ChimeriVax<sup>®</sup>-DEN2 do que YF-VAX<sup>®</sup> desenvolveram viremia em um ou mais dias de estudo: 8 (57%) no grupo de ChimeriVax<sup>®</sup>-DEN2 5,0  $\log_{10}$  e 9 (64%) no grupo ChimeriVax<sup>®</sup>-DEN2 3,0  $\log_{10}$  PFU, comparado com 2 (14%) no grupo YF-VAX<sup>®</sup>. Números ligeiramente maiores de indivíduos YF-imunes, comparado com indivíduos YF-naïve, desenvolveram viremia seguindo vacinação com ChimeriVax<sup>®</sup>-DEN2 5,0  $\log_{10}$  PFU (11/14 [79%] em indivíduos YF-imune vs. 25 8/14 [57%] em indivíduos YF-naïve), mas a diferença não foi estatisticamente significante ( $p=0,4724$ ). Mais indivíduos desenvolveram viremia entre os dias 5-7. As medições de viremia quantitativas (pico médio, duração da média, AUC) foram também maiores no grupo YF-imune, mas novamente as diferenças não foram estatisticamente significantes e importantemente nenhuma impacto no perfil de segurança foi observado.

**Tabela 1:** Medições de sumário de viremia

Grupo de Tratamento	YF-VAX® 5,04 $\log_{10}$ PFU YF-naïve	Chimeri-Vax®-DEN2 3,0 $\log_{10}$ PFY YF-naïve	Chimeri-Vax®-DEN2 2,5 $\log_{10}$ PFY YF-naïve	Chimeri-Vax®-DEN2 5,0 $\log_{10}$ PFY YF-imune	Valor P <sup>c</sup>
Nº de indivíduos	14	14	14	14	
Nº (%) de indivíduos virêmicos	2 (14)	9 (64)	8 (57)	11 (79)	0,4724
Pico (PFU <sup>a</sup> /mL) [SD]	20,0 [51,44]	11,4 [12,31]	12,1 [16,72]	29,3 [38,72]	0,1484
Duração (Dias) [SD]	0,4 [1,16]	1,2 [1,42]	1,4 [1,65]	1,9 [1,23]	0,2357
AUC <sup>b</sup> (PFU/mL) [SD]	44,3 [116,86]	20,0 [33,74]	20,7 [32,04]	50,4 [67,61]	0,0908

<sup>a</sup> PFU=unidades de formação de placa, medidas em culturas de célula Vero

<sup>b</sup>Área sob a curva

<sup>c</sup>Comparação em par de ChimeriVax®-DEN2 5,0  $\log_{10}$  em indivíduos PFY

5 YF-naïve versus imunes

#### Anticorpos de Neutralização

Três cepas do tipo selvagem diferentes do dengue tipo 2 (16681, JAH e PR-159), bem como a cepa da vacina homóloga (ChimeriVax®-DEN2), foram usadas em testes de neutralização. Cepas do tipo selvagem

10 de sorotipos do dengue heterólogos 1 (16007), 3 (16562) e 4 (1036) foram também usadas para medir a extensão da resposta de anticorpo de neutralização. A proporção de indivíduos soroconvertendo (demonstrando um título de anticorpo de neutralização pelo menos superior ou igual a 1:10 entre Dia 1 e Dia 30) foi determinada. Ainda, os títulos de anticorpo de neutralização 15 médios geométricos foram medidos.

O Teste de Neutralização de Redução de Placa (PRNT50) usado para CVD2, PR-159 e JAH compreende as etapas que seguem:

Soro inativado com calor foi serialmente diluído duas vezes e misturado com um volume igual de vírus para atingir 30/50 pfu/poco. As misturas de soro-vírus foram incubadas a 4°C por 18 +/- horas, então adicionadas a monocamadas de célula Vero em placas de cultura de 12 poços. Após 5 uma incubação de 60 +/- 10 minutos, as monocamadas foram revestidas com 0,84% de carboximetilcelulose em meio de crescimento. As placas foram então incubadas a 37°C sob CO<sub>2</sub> a 5% por 3-5 dias.

As monocamadas foram fixadas com 7,4% de formalina, então bloqueadas e permeabilizadas com 2,5% de leite em pó sem gordura em 10 PBS-Tween20 mais 0,5% de Triton X-100. Anticorpo primário antidengue 2 (3H5, 1:5000) foi incubado 60 +/- 10 minutos, seguido por fosfatase alcalina IgG anti-camundongo de cabra (1:500). Após 60 +/- 10 minutos de incubação, substrato, BCIP-NBT contendo levamisol a 0,36 mM, foi adicionado. A reação foi parada após tingimento suficiente ter ocorrido.

15 As placas foram contadas e títulos de PRNT<sub>50</sub> foram determinados. Títulos de PRNT<sub>50</sub> foram definidos como a primeira diluição de soro onde a contagem de placa é igual a ou menos do que 50% da contagem de placa de controle negativo. Um soro é considerado ser positivo para a presença de anticorpos de neutralização quando o título de anticorpo de neutralização então determinado for pelo menos superior ou igual a 1:10.

20 Para as outras cepas, o ensaio PRNT50 foi realizada em outro laboratório de acordo com o protocolo que segue descrito por Russell e outros (*J. Immunol.* 99:285-290, 1967). Contagem de placa foi determinada usando a técnica de revestimento único de ensaio de placa LLC-MK2. Soros 25 são congelados, diluídos e inativados com calor através de incubação a 56°C por 30 minutos. Diluições de 4 vezes, seriais, de soro são feitas (1:5, 1:10, 1:40, 1:160 e 1:640). Um volume igual de vírus do dengue diluído para conter cerca de 40-60 pfu é adicionado a cada tubo de diluição de soro. Segundo incubação a 37°C por 60 minutos, 0,2 mL é removido de cada tubo e 30 inoculado em poços em triplicata de LLC-MK2 confluente em uma placa de 6 poços. Cada poço é incubado a 37°C por 90 minutos e as monocamadas são então revestidas com 4 mL de Carbóxi Metil Celulose a 1%/Meio Modifi-

cado da Earle. As placas são incubadas por 7 dias a 37°C sob CO<sub>2</sub> a 5%. As placas são então contadas, e o PRNT50 é determinado usando papel log-probit. A redução percentual de placas em cada nível de diluição é posta em gráfico para determinar o título de redução de 50%: pontos de redução de 5 placa entre 15% e 85% são usados. Os resultados são expressos como recíproca da diluição. Um soro é considerado ser positivo quanto à presença de anticorpos de neutralização quando o título dos anticorpos de neutralização então determinado é pelo menos superior ou igual a 1:10.

#### Resposta 30 Dias Após Vacinação

10 No Dia 31, taxas de soroconversão eram altas contra vírus do tipo 2 do dengue em todos os grupos vacinados com ChimeriVax<sup>®</sup>-DEN2. Taxas de soroconversão baixas para sorotipos de DEN heterólogos 1, 3 e 4 foram observadas em indivíduos YH-naïves inoculados com ChimeriVax<sup>®</sup>-DEN2 em dose alta ou baixa. Taxas de soroconversão para DEN1 eram 15 23% e 23% nos grupos de dose 5,0 e 3,0 log<sub>10</sub> PFU, respectivamente (Tabela 2); para DEN3 15% e 23%, respectivamente; e para DEN4 0% e 0%, respectivamente. Em contraste, 100% de indivíduos YF-imune inoculados com ChimeriVax<sup>®</sup>-DEN2 soroconverteram para todos os sorotipos DEN heterólogos.

20 Vacina ChimeriVax<sup>®</sup>-DEN2 induziu títulos de anticorpo de neutralização cruzada muito baixos para os sorotipos heterólogos 1, 3 e 4 em indivíduos YF-naïve (Tabela 3). Títulos de anticorpo de neutralização médios geométricos contra sorotipos do dengue heterólogos no Dia 31 foram significantemente maiores em indivíduos YF-imunes vacinados com ChimeriVax<sup>®</sup>-DEN2 do que indivíduos YF-naïve. Para DEN1, títulos de anticorpo médios geométricos em indivíduos YF-imunes e indivíduos YF-naïve vacinados ou com ChimeriVax<sup>®</sup>-DEN2 5,0 ou 3,0 log<sub>10</sub> PFU foram 79 vs. 10 e 12, respectivamente ( $p<0,0001$ ). Similarmente, para DEN3, os títulos foram 73 vs. 13 e 12 ( $p<0,0001$ ) (Tabela 3). Nenhum dos indivíduos YF-naïve soroconverteram 25 para DEN4. O título de anticorpo de neutralização médio geométrico para DEN4 em indivíduos YF-imunes foi 57.

**Tabela 2:** Taxa de soroconversão (%) pelo grupo de tratamento, dia 31

Vírus usado no teste de neutralização	YF-VAX® YF-naïve N=13	CV-DEN2 3,0 log <sub>10</sub> PFU YF-naïve N=13	CV-DEN2 5,0 log <sub>10</sub> PFU YF-naïve N=13	CV-DEN2 5,0 log <sub>10</sub> PFU YF-naïve N=14
DEN2: cepa 16681	0%	92,3%	100%	100%
DEN2: ChimeriVax®-D2	0	100	100	100
DEN2: cepa PR-159	0	84,6	92,3	100
DEN2: cepa JaH	0	92,3	92,3	100
DEN1: cepa 16007	0	23,1	23,1	100
DEN3: cepa 16562	0	23,1	15,4	100
DEN4: cepa 1036	0	0	0	100

**Tabela 3:** Título de anticorpo médio geométrico pelo grupo de tratamento, dia 31

Vírus usado no teste de neutralização	YF-VAX® YF-naïve N=13	CV-DEN2 3,0 log <sub>10</sub> PFU YF-naïve N=13	CV-DEN2 5,0 log <sub>10</sub> PFU YF-naïve N=13	CV-DEN2 5,0 log <sub>10</sub> PFU YF-naïve N=14
DEN2: cepa 16681	<10	365,0	358,6	383,3
DEN2: ChimeriVax®-D2	<10	570,0	921,3	975,4
DEN2: cepa PR-159	<10	313,8	217,3	724,5
DEN2: cepa JaH	<10	227,8	240,3	463,9
DEN1: cepa 16007	<10	12,0	10,1	79,2
DEN3: cepa 16562	<10	11,8	13,2	73,2

Vírus usado no teste de neutralização	YF-VAX® YF-naïve N=13	CV-DEN2 3,0 log <sub>10</sub> PFU YF-naïve N=13	CV-DEN2 5,0 log <sub>10</sub> PFU YF-naïve N=13	CV-DEN2 5,0 log <sub>10</sub> PFU YF-naïve N=14
DEN4: cepa 1036	<10	<10	<10	57,3

Resposta 6 meses após vacinação

Resposta em 6 meses após vacinação é dada nas Tabelas 4 e 5, abaixo. Em 6 meses, taxas de soropositividade baixas para sorotipos de DEN heterólogos 1,3 e 4 foram observadas em indivíduos YF-naïve inoculados com ChimeriVax®-DEN2 em dose alta ou baixa. Taxas de soroconversão para DEN1 foram 23% e 31% nos grupos de dose de 5,0 e 3,0 log<sub>10</sub> PFU, respectivamente (Tabela 4); para DEN3 15% e 23%, respectivamente; e para DEN4 8% e 8%, respectivamente. Em contraste, 100% de indivíduos YF-imunes inoculados com ChimeriVax®-DEN2 eram soropositivos para DEN 1 a 3, e 64% para DEN4.

A vacina ChimeriVax®-DEN2 induziu títulos de anticorpo de neutralização de reatividade cruzada baixos para os sorotipos heterólogos 1, 3 e 4 em indivíduos YF-naïve (Tabela 5). Títulos de anticorpo de neutralização médios geométricos contra sorotipos do dengue heterólogos em 6 meses foram maiores em indivíduos YF-imunes vacinados com ChimeriVax®-DEN2 do que em indivíduos YF-naïve. Para DEN1, os títulos de anticorpo médios químéricos em indivíduos YF-imunes e indivíduos YF-naïve vacinados ou com 5,0 ou 3,0 log<sub>10</sub> PFU de ChimeriVax®-DEN2, eram 285 vs. <10 e 14, respectivamente. Similarmente, para DEN3, os títulos eram 268 vs. <10 e <10 (Tabela 5).

Tabela 4: Proporção de soropositivo (%) por grupo de tratamento, 6 meses

Vírus usado no teste de neutralização	YF-VAX® YF-naïve N=13	CV-DEN2 3,0 log <sub>10</sub> PFU YF-naïve N=13	CV-DEN2 5,0 log <sub>10</sub> PFU YF-naïve N=13	CV-DEN2 5,0 log <sub>10</sub> PFU YF-naïve N=14
DEN2: cepa 16681	0%	100%	100%	100

Vírus usado no teste de neutralização	YF-VAX® YF-naïve N=13	CV-DEN2 3,0 log <sub>10</sub> PFU YF-naïve N=13	CV-DEN2 5,0 log <sub>10</sub> PFU YF-naïve N=13	CV-DEN2 5,0 log <sub>10</sub> PFU YF-naïve N=14
DEN2: ChimeriVax®-D2	0	100	100	100
DEN2: cepa PR-159	0	84,6	76,9	92,9
DEN2: cepa JaH	0	76,9	69,2	92,9
DEN1: cepa 16007	0	30,8	23,1	100
DEN3: cepa 16562	0	23,1	15,4	100
DEN4: cepa 1036	0	7,7	7,7	64,3

**Tabela 5:** Título de anticorpo médio geométrico por grupo de tratamento, 6 meses

Vírus usado no teste de neutralização	YF-VAX® YF-naïve N=13	CV-DEN2 3,0 log <sub>10</sub> PFU YF-naïve N=13	CV-DEN2 5,0 log <sub>10</sub> PFU YF-naïve N=13	CV-DEN2 5,0 log <sub>10</sub> PFU YF-naïve N=14
DEN2: cepa 16681	<10	568,6	285,1	870,2
DEN2: ChimeriVax®-D2	<10	606,8	303	672
DEN2: cepa PR-159	<10	55,1	49,5	160
DEN2: cepa JaH	<10	29,0	24,7	72,5
DEN1: cepa 16007	<10	14,4	<10	285,1
DEN3: cepa 16562	<10	<10	<10	268,1
DEN4: cepa 1036	<10	<10	<10	23,8

Resposta 1 ano após vacinação

Em 12 meses, taxas de soropositividade eram mais altas contra 5 vírus do dengue tipo 2 no grupo YF-imune vacinado com ChimeriVax®-DEN2. Isto era particularmente evidente quando as cepas DEN2 PF-159 e

JAH foram consideradas. Essas suas cepas são das Américas e pertencem a dois grupos variantes distintos (Américas I e II, respectivamente).

Taxas de soropositividade baixas para sorotipos de DEN heterólogos 1, 3 e 4 foram observadas em indivíduos YF-naïves inoculados com ChimeriVax®-DEN2 em dose alta ou baixa. Taxas de soroconversão para DEN1 eram 23% e 31% nos grupos de dose de 5,0 e 3,0  $\log_{10}$  PFU, respectivamente (Tabela 6); para DEN3 8% e 23%, respectivamente; e para DEN4 8% e 9%, respectivamente. Em contraste, 100% dos indivíduos YF-imunes inoculados com ChimeriVax®-DEN2 eram soropositivos para DEN 1 e 3, e 29% para DEN4.

A vacina ChimeriVax®-DEN2 induziu títulos de anticorpo de neutralização reativa cruzada para as cepas DEN2 JaH e PR-159 e para sorotipos heterólogos 1, 3 e 4 em indivíduos YF-naïve (Tabela 7). Títulos de anticorpo de neutralização médios geométricos contra sorotipos do dengue heterólogos em 12 meses foram显著mente maiores em indivíduos YF-imunes vacinados com ChimeriVax®-DEN2 do que em indivíduos YF-naïve. Para DEN1, títulos de anticorpo médios geométricos em indivíduos YF-imunes e indivíduos YF-naïve vacinados ou com 5,0 ou 3,0  $\log_{10}$  PFU de ChimeriVax®-DEN2, foram 89 vs. 10 e 13, respectivamente ( $p<0,0001$ ). Similarmente, para DEN3, títulos foram 72 vs. <10 e <10 ( $p<0,0001$ ) (Tabela 7).

Tabela 6: Proporção de soropositivo (%) por grupo de tratamento, 12 meses

Vírus usado no teste de neutralização	YF-VAX® YF-naïve N=13	CV-DEN2 3,0 $\log_{10}$ PFU YF-naïve N=13	CV-DEN2 5,0 $\log_{10}$ PFU YF-naïve N=13	CV-DEN2 5,0 $\log_{10}$ PFU YF-naïve N=14
DEN2: cepa 16681	0%	100%	100%	100
DEN2: Chimeri-Vax®-D2	0	100	100	100
DEN2: cepa PR-159	0	69,2	69,2	92,9
DEN2: cepa JaH	0	61,5	53,8	85,7
DEN1: cepa 16007	0	30,8	23,1	100

Vírus usado no teste de neutralização	YF-VAX® YF-naïve N=13	CV-DEN2 3,0 log <sub>10</sub> PFU YF-naïve N=13	CV-DEN2 5,0 log <sub>10</sub> PFU YF-naïve N=13	CV-DEN2 5,0 log <sub>10</sub> PFU YF-naïve N=14
DEN3: cepa 16562	0	23,1	7,7	100
DEN4: cepa 1036	0	0	7,7	28,6

Tabela 7: Título de anticorpo médio geométrico por grupo de tratamento, 12 meses

Vírus usado no teste de neutralização	YF-VAX® YF-naïve N=13	CV-DEN2 3,0 log <sub>10</sub> PFU YF-naïve N=13	CV-DEN2 5,0 log <sub>10</sub> PFU YF-naïve N=13	CV-DEN2 5,0 log <sub>10</sub> PFU YF-naïve N=14
DEN2: cepa 16681	<10	368,9	183,3	744,1
DEN2: Chimeri-Vax®-D2	<10	272,7	272,7	320,0
DEN2: cepa PR-159	<10	42,2	30,6	72,5
DEN2: cepa JaH	<10	18,0	14,5	32,8
DEN1: cepa 16007	<10	13,1	10,1	89,2
DEN3: cepa 16562	<10	<10	<10	71,8
DEN4: cepa 1036	<10	<10	<10	<10

#### Resposta de Anticorpo da Febre Amarela

Surpreendentemente, dos 14 indivíduos YF-imunes que foram inoculados com ChimeriVax®-DEN2, apenas 2 (14%) tiveram um reforço em anticorpo YF. Então, enquanto imunidade YF preexistente reforçou a resposta a sorotipos 1-4 do dengue após vacinação com ChimeriVax®-DEN2, a recíproca não era verdadeira (isto é, ChimeriVax®-DEN2 não reforçou anticorpo para vírus da febre amarela). Este resultado é inesperado, uma vez que o mecanismo que baseia a resposta de anticorpo ampliada para dengue em pacientes imunes para febre amarela que receberam ChimeriVax®-DEN2 (epítopos compartilhados entre proteínas envelope da febre amarela e do

dengue) teria sido esperado resultar em um reforço em anticorpos de febre amarela seguindo ChimeriVax®-D2. Os resultados ilustram a imprevisibilidade de respostas imunes protetoras cruzadas a flavivírus e enfatizam a inovação da presente invenção.

## 5 Respostas de Célula T

Respostas de célula T foram avaliadas através da produção de IFNy em resposta a antígeno viral em sobrenadantes de cultura. Indivíduos foram avaliados com lisato de célula viral inativada, que foi mostrado gerar respostas de célula T CD4+ primariamente para a vacina, mas algumas células CD8+ são também produzidas (Mangada e outros, *J. Immunol. Methods*, 284:89-97, 2004).

### Materiais e Procedimentos Experimentais

A resposta de célula T foi avaliada nos Dias 1 e 32 através da medição da produção de IFNy por PBMC estimulada em cultura com antígeno de vírus inativado. Sangue integral foi coletado nos Dias 1 e 31 em tubos de preparação de célula Vacutainer (CPT, BDBiosciences) e enviado para Acambis, Inc. para isolamento e criopreservação de PBMC. As células foram lavadas em RPMI 1640, criopreservadas em soro AB humano inativado com calor (SeraCare, Oceanside CA) contendo DMSO a 10%, armazenadas em nitrogênio líquido e descongeladas imediatamente antes do teste. Para medição da produção de IFNy, PBMC foram culturadas em placas de fundo plano de 96 poços a  $1,5 \times 10^5$  células por poço por 7 dias a 37°C com 3 antígenos de célula de vírus inativado com glutaraldeído diferentes: (1) vírus ChimeriVax®-DEN2 (crescido em células Vero), (2) vírus do dengue 2 cepa PUO218 (vírus do dengue tipo 2 selvagem em células C6/36) e (3) vírus YF (crescido em células Vero). Controles consistiam em células Vero e/ou C6/36 falso-infectadas inativadas. Antígeno viral inativado ou antígeno de célula de controle foi adicionado em uma concentração de 1:100 (15). PBMC foram também estimuladas com 1 µg/ml de ConA como um controle positivo de ensaio. Produção de IFNy foi determinada através de ELISA usando sobrenadantes de cultura coletados no Dia 7.

### ELISA de IFNy

Sobrenadantes de cultura foram analisados quanto ao teor de IFNy através de um ensaio ELISA indireto (OptEIA® human IFNy Kit, BD Bioscience-Pharmingen, N° Cat. 555142) de acordo com as instruções do fabricante.

5 **Produção de Cticina IFNy**

Produção de citocina IFNy foi comparada no Dia 1 e no Dia 31 do estudo (antes da vacinação e no Dia 30 após vacinação) através de teste da resposta a antígenos de vírus inativado. A vacina administrada (ChimeriVax®-DEN2), a origem do vírus do dengue tipo 2 selvagem (PUO218) e o vírus controle administrado (YF-VAX®) foram testados. ChimeriVax®-DEN2 que cresceu em células Vero tinha muito pouco informação (background) no Dia 0, enquanto o vírus do dengue-2 crescido em células C6/36 produziu respostas em alguns dos indivíduos. Não obstante, ambos antígenos aumentaram a produção de IFNy em cada um dos quatro grupos de vacina. A YF-VAX® não era muito imunogênica em nenhum dos indivíduos, mas ela mostrou um aumento no Dia 31 com relação ao Dia 1, especialmente nos indivíduos vacinados para YF.

Comparações entre grupo de vacinação foram feitas usando a diferença entre valores no Dia 31 e Dia 1 (Figura 1). Todos os grupos responderam a cada um dos antígenos inativados. Os indivíduos que receberam  $10^3$  ou  $10^5$  PFU de vacina ChimeriVax®-DEN2 tinham níveis de IFNy equivalentes. No ensaio ELISA IFNy, indivíduos vacinados com ChimeriVax®-DEN2 tinham respostas ligeiramente maiores do que indivíduos vacinados para YF (não significante) (Figura 1).

25 Os indivíduos que eram pré-imunes YF tinham um aumento no número de respondedores e um aumento no nível de IFNy médio (Figura 1). A Tabela 8 sumariza os resultados mostrando o número de respondedores como uma fração do total. Cerca de 65% dos indivíduos vacinados com ChimeriVax®-DEN2 e YF tinham uma resposta IFNy positiva para a vacina 30 administrada como antígeno de teste, enquanto aproximadamente 90% de indivíduos pré-imunes vacinados com ChimeriVax®-DEN2 tinham uma resposta positiva (Tabela 8).

**Tabela 8:** Número de indivíduos que responderam à vacina com base em resposta de IFNy

Grupo de Imunização YF	CVD2	Den2 PUO218
CVD2 103 /14	9/14	8/14
CVD2 105 1/14	9/14	7/14
YF105 3/14	9/14	4/14
YF-CVD2 105 0/14	13/14	7/14

Resposta positiva definida como um informação (background) de 5 vezes ou  $\geq 50$  pg/ml no Dia 30 se o Dia 1 for menor do que 10 pg/ml (abaixo da sensibilidade).

Os resultados deste estudo mostram que aproximadamente 65% dos indivíduos vacinados com ChimeriVax®-DEN2 e YF tinham uma resposta de célula T positiva à vacina administrada como antígeno de teste, enquanto ~90% de indivíduos pré-imunes YF vacinados com ChimeriVax®-

10 DEN2 tinham respostas positivas (definido por uma resposta IFNy). Produção de IFNy foi a maior em resposta ao vírus da vacina ChimeriVax®-DEN2.

As respostas de célula T neste teste clínico estavam de acordo com as respostas de anticorpo de neutralização, pelo fato de que ambas doses de vacina estimularam respostas imunes de célula T similares, e imunidade anterior para vírus da febre amarela não inibiu a resposta de célula T para ChimeriVax®-DEN2. As respostas de IFNy foram virtualmente as mesmas para as 2 doses de ChimeriVax®-DEN2 ( $10^3$  e  $10^5$  pfu). A resposta de IFNy para ChimeriVax®-DEN2 não foi diminuída pela vacinação anterior com vírus da febre amarela e números ainda mais altos de respondedores foram vistos, sugerindo uma tendência para imunidade de célula T realçada em

15 indivíduos pré-imunes YF.

20 O antígeno inativado usado no ensaio identificou os respondedores mais fortes, mas não determinou as proteínas específicas contra as quais a resposta imune foi gerada. Visto que um antígeno de dengue inativo foi usado, é provável que respostas CD4+ primariamente sejam medidas.

Exemplo 2: Vacina do Dengue Tetravalente

Plano de Estudo e Métodos

Neste exemplo, foi avaliada em indivíduos humanos a resposta imune à imunização sequencial com vacina da febre amarela 17D seguido pela administração de uma mistura de quatro (4) vírus da febre amarela químéricos que compreendiam cada um proteínas de membrana e envelope de sorotipos do dengue que são diferentes um do outro (tetravalente ChimeriVax®-DEN). O primeiro estágio do estudo foi para avaliar a segurança, tolerabilidade e imunogenicidade da vacina ChimeriVax®-DEN tetravalente contendo sorotipos DEN 1, 2, 3 e 4 em comparação com uma vacina da febre amarela (YF) (YF-VAX®) e um placebo. O segundo estágio do teste avaliou a segurança e imunogenicidade de administração sequencial de YF-VAX®/ChimeriVax®-DEN tetravalente versus duas doses de ChimeriVax®-DEN tetravalente dadas em um intervalo de 5-9 meses.

O estudo consistia em um período de avaliação de 3 a 21 dias antes da primeira vacinação, um período de tratamento duplo-cego após a primeira vacinação de 1 mês e um segundo período de avaliação do dia 3 ao 21, antes de um período de tratamento aberto de 30 dias começando 5 a 9 meses após a primeira vacinação. Uma visita de acompanhamento em 12 meses foi planejada.

No primeiro estágio do estudo, 3 grupos de 33 indivíduos masculinos e femininos adultos saudáveis receberam uma vacinação de ChimeriVax®-DEN tetravalente (grupo 1), YF-VAX® (grupo 2) ou placebo (YF-VAX® diluente – grupo 3), para um total de 99 indivíduos.

Antes da condução de quaisquer procedimentos relacionados ao estudo, os indivíduos deram consentimento informado escrito. Durante a avaliação, a qualificação foi avaliada através de uma história médica, um exame físico, sinais vitais, química clínica, hematologia e sorologia (incluindo gravidez no soro em indivíduos femininos) e amostra da urina para urinálise. No Dia 1, indivíduos receberam uma vacinação subcutânea duplo-cega na área deltoide e então foram à clínica nos dias 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 e 21 para entrevista AE e coleta de amostra de sangue para viremia. Ainda, nos Dias 5, 9, 11 e 15, os indivíduos proveram uma amostra de sangue para avaliações de laboratório clínicas. Nos Dias 11 e 31, e em 5-9 meses, os

indivíduos proveram uma amostra de sangue para análise de anticorpo.

Nos meses 5 a 9, qualificação continuada foi avaliada e uma história médica por um tempo determinado foi registrada. Indivíduos qualificados receberam uma segunda vacinação (vacina ChimeriVax®-DEN tetravalente) subcutaneamente na área deltoide. Os indivíduos compareceram na clínica 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 e 20 dias depois para entrevista AE e coleta de amostra de sangue para viremia. Amostras de sangue para testes de anticorpo foram obtidas 10 e 30 dias após esta segunda vacinação.

Todos os indivíduos retornaram à clínica 12 meses depois da vacinação inicial (3-7 meses após a segunda vacinação) para testes de anticorpo. O plano do estudo é mostrado nas Tabelas 9 e 10.

Tabela 9: Tratamentos a serem administrados no Dia 1

Grupo	Placebo	ChimeriVax®-DEN tetravalente $\log_{10}$ TCID50/dose	YF-VAX® $\log_{10}$ PFU/dose	N
1	-	~4 ea. Componente	-	33
2	-	-	>4,74	33
3	0,5 mL	-	-	33

Tabela 10. Tratamentos a serem administrados em 5 a 9 meses

Grupo	ChimeriVax®-DEN tetravalente $\log_{10}$ TCID50/dose	N
1	~4 ea. Componente	33
2	-	33
3	-	33

A dose de ChimeriVax®-DEN Tetravalente precisa por sorotipo é determinada através do ensaio TCID<sub>50</sub> como sendo 3,7/ 3,1/ 3,8/ 3,2 TCID<sub>50</sub> para sorotipos 1, 2, 3 e 4 respectivamente.

Os critérios para avaliação de respostas imunes foram como segue:

O ponto final primário para imunogenicidade é a taxa de soro-

conversão para sorotipos do dengue 1-4 no Dia 31, usando teste de neutralização de redução de placa 50% de diluição de soro, vírus constante, realizado conforme descrito no Exemplo 1. Esta análise define as taxas de soroconversão para todos os quatro sorotipos do dengue e para cada sorotipo individual. Indivíduos que são soronegativos na linha de base ( $<1:10$ ) vão requerer um título de  $PRNT_{50} \geq 1:10$  para satisfazer os critérios para soroconversão.

Pontos finais secundários incluíram a análise de título de anticorpo de neutralização médio geométrico para cada sorotipo do dengue e taxa de soroconversão 5 a 9 meses após a primeira vacinação e 12 meses após a primeira vacinação (isto é, 3-7 meses após a segunda vacinação, de reforço). Essas respostas sorológicas são comparadas com indivíduos que receberam (a) uma dose única de ChimeriVax<sup>®</sup>-DEN tetravalente; (b) duas doses de ChimeriVax<sup>®</sup>-DEN tetravalente ou (c) uma dose de vacina da febre amarela 17D (YF-VAX<sup>®</sup>) seguido por 1 dose de ChimeriVax<sup>®</sup>-DEN tetravalente administrada 5-9 meses depois.

### Resultados

O objetivo do estudo era avaliar a extensão da resposta imune em todo os 4 sorotipos do dengue seguindo regimes de imunização diferentes. O objetivo de imunização de indivíduos humanos contra doença do vírus do dengue é atingir uma resposta de anticorpo de neutralização cruzada mais ampla possível. As respostas imunes de todos os indivíduos (que eram *naïve* para dengue e febre amarela na linha de base) 30 dias após a segunda dose de medicação de estudo são mostradas na Tabela 11 (resultados contra cepas do tipo selvagem).

54 indivíduos (que eram *naïve* para dengue e febre amarela na linha de base) receberam uma dose única de ChimeriVax<sup>®</sup>-DEN tetravalente no Dia 1 ou placebo no Dia 1 seguido por uma dose única de ChimeriVax<sup>®</sup>-DEN tetravalente em 5-9 meses. As respostas de anticorpo de neutralização 30 dias após receberem a vacina ativa nesses grupos são combinadas e são mostradas na coluna à direita mais distante da Tabela 11. Uma minoria dos indivíduos que receberam uma inoculação única de ChimeriVax<sup>®</sup>-DEN tetra-

valente teve uma resposta imune reativa cruzada para sorotipo do dengue 3 ou 4. Apenas 43% e 17% dos indivíduos recebendo uma dose de ChimeriVax®-DEN tetravalente desenvolveram anticorpos de neutralização para pelo menos sorotipo 3 ou 4 do dengue, respectivamente.

5 27 indivíduos (que eram *naïve* para dengue e febre amarela na linha de base) receberam 2 doses de ChimeriVax®-DEN tetravalente no Dia 1 e em 5-9 meses (Grupo 1). As respostas de anticorpo de neutralização são mostradas na Tabela 11. A extensão da resposta de anticorpo de neutralização no Grupo 1 era maior do que em indivíduos que receberam apenas uma  
10 dose de ChimeriVax®-DEN tetravalente. 55,6% e 40,7% de indivíduos que receberam duas doses de ChimeriVax®-DEN tetravalente desenvolveram anticorpos de neutralização para sorotipo do dengue 3 ou 4, respectivamente.

15 26 indivíduos (que eram *naïve* para dengue e febre amarela na linha de base) receberam vacina para febre amarela (YF-VAX®) no Dia 1 seguido por uma dose de ChimeriVax®-DEN tetravalente em 5-9 meses (Grupo 2). As respostas de anticorpo de neutralização no Grupo 2 são mostradas na Tabela 11. A extensão da resposta de anticorpo de neutralização no Grupo 2 era maior do que aquela em indivíduos que receberam ou uma dose  
20 de ChimeriVax®-DEN tetravalente ou duas doses de ChimeriVax®-DEN tetravalente separadas por 5-9 meses. 92% e 65% dos indivíduos recebendo imunização sequencial com vacina da febre amarela e vacina ChimeriVax®-DEN tetravalente desenvolveram anticorpos de neutralização para pelo menos sorotipo 3 ou 4 do dengue, respectivamente.

25 Os resultados mostram claramente que um regime de imunização sequencial onde vacina da febre amarela é dada antes de uma vacina ChimeriVax®-DEN tetravalente resulta em uma resposta imune superior ao dengue com reatividade cruzada ampla em todos os sorotipos do dengue, que pode ser conseguida com uma ou duas doses de vacina ChimeriVax®-  
30 DEN tetravalente testada sozinha.

Embora a invenção acima tenha sido descrita em alguns detalhes a título de ilustração e exemplo para propósitos de clareza de compre-

ensão, será prontamente aparente àqueles versados na técnica à luz dos ensinamentos da presente invenção que certas mudanças e modificações podem ser feitas nela sem se afastar do espírito ou escopo das reivindicações apensas. Todas as referências citadas acima são incorporadas aqui a

5 título de referência.

Tabela 11: Período de Tratamento Aberto

Resposta de Anticorpo Antes da Vacinação e em 10 e 30 Dias após a Se-  
gunda Vacinação (administrada 5-9 meses após a dose primária) Contra

Pelo menos Um Sorotipo. Pelo Menos Dois Sorotipos, Pelo menos Três So-  
10 rotipos e para os Quatro Sorotipos de Cepas de Dengue (tipos 1-4), pelo

Grupamento de Tratamento

Tempo Após Vaci- nação [1]	Soropositivo [2]	Grupo 1: ChimeriVax- DEN -> ChimeriVax- DEN (N=27)		Grupo 2: YF-VAX -> ChimeriVax- DEN (N=26)		ChimeriVax=DEN Dose Única A- grupada N(=54)
		Sim	Não	Sim	Não	
0 dia		26 (96,3%)	6 (23,1%)	7 (13,0%)		
	Sim	1 (3,7%)	20 (76,9%)	47 (87,0%)		
	Não	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)		
	Falta					
Pelo menos um soroti- po	10 dias	24 (88,9%)	14 (53,8%)	9 (16,7%)		
	Sim	1 (3,7%)	10 (38,5%)	43 (79,6%)		
	Não	2 (7,4%)	2 (7,7%)	2 (3,7%)		
	Falta					
30 dias		27 (100,0%)	25 (96,2%)	52 (96,3%)		
	Sim	0 (0,0%)	1 (3,8%)	2 (3,7%)		
	Não	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)		
	Falta					
Pelo menos dois soroti- pos	0 dias	18 (66,7%)	3 (11,5%)	1 (1,9%)		
	Sim	9 (33,3%)	23 (88,5%)	53 (98,1%)		
	Não	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)		
	Falta					

Tempo Após Vaci- nação [1]	Soropositivo [2]	Grupo 1: ChimeriVax- DEN -> ChimeriVax- DEN (N=27)		Grupo 2: YF-VAX -> ChimeriVax- DEN (N=26)	ChimeriVax=DEN Dose Única A- grupada N(=54)
10 dias	Sim	21 (77,8%)	3 (11,5%)	4 (7,4%)	
	Não	4 (14,8%)	21 (80,8%)	48 (88,9%)	
	Falta	2 (7,4%)	2 (7,7%)	2 (3,7%)	
30 dias	Sim	23 (85,2%)	24 (92,3%)	42 (77,8%)	
	Não	4 (14,8%)	2 (7,7%)	12 (22,2%)	
	Falta	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
0 dias	Sim	8 (29,6%)	1 (3,8%)	0 (0,0%)	
	Não	19 (70,4%)	25 (96,2%)	54 (100,0%)	
	Falta	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
Pelo menos três soroti- pos	10 dias	Sim	15 (55,6%)	2 (7,7%)	1 (1,9%)
		Não	10 (37,0%)	22 (84,6%)	51 (94,4%)
		Falta	2 (7,4%)	2 (7,7%)	2 (3,7%)
30 dias	Sim	15 (55,6%)	24 (92,3%)	23 (42,6%)	
	Não	12 (44,4%)	2 (7,7%)	31 (57,4%)	
	Falta	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
Todos os 4 soroti- pos	0 dias	Sim	4 (14,8%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
		Não	23 (85,2%)	26 (100,0%)	54 (100,0%)
		Falta	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
10 dias	Sim	7 (25,9%)	1 (3,8%)	0 (0,0%)	
	Não	18 (66,7%)	23 (88,5%)	52 (96,3%)	
	Falta	2 (7,4%)	2 (7,7%)	2 (3,7%)	

Tempo Após Vaci- nação [1]	Soropositivo [2]	Grupo 1: ChimeriVax- DEN -> ChimeriVax- DEN (N=27)		Grupo 2: YF-VAX -> ChimeriVax- DEN (N=26)	ChimeriVax=DEN Dose Única A- grupada N(=54)
30 dias	Sim	11 (40,7%)	17 (65,4%)	9 (16,7%)	
	Não	16 (59,3%)	9 (34,6%)	45 (83,3%)	
	Falta	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	

[1] Dia 0 é o dia quando a segunda vacinação foi administrada em 5-9 meses. O anticorpo medido neste ponto de tempo é o resultado da primeira vacinação 5-9 meses antes.

[2] Título de anticorpo de neutralização  $\geq 10$

## REIVINDICAÇÕES

1. Uso de uma vacina do vírus da febre amarela e de uma vacina de flavivírus quimérico compreendendo pelo menos um flavivírus quimérico compreendendo uma estrutura principal do vírus da febre amarela onde a sequência codificando a proteína envelope do vírus da febre amarela foi substituída com uma sequência codificando a proteína envelope de um vírus da dengue, caracterizado pelo fato de ser para a preparação de uma combinação/kit para a indução de uma resposta imune de neutralização cruzada, de longa duração, para o vírus da dengue.  
5
- 10 2. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o flavivírus quimérico compreende uma estrutura principal do vírus da febre amarela na qual as sequências codificando as proteínas de membrana e envelope do vírus da febre amarela foram substituídas com as sequências codificando as proteínas de membrana e envelope de um vírus do dengue.
- 15 3. Uso de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que as proteínas envelope do dengue e/ou de membrana do dengue são proteínas embaralhadas.
- 20 4. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a vacina de flavivírus quimérico é administrada ao paciente 30, 60 ou 90 dias após administração da vacina da febre amarela.
5. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o flavivírus quimérico é composto de uma estrutura principal de vírus YF17D.
- 25 6. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a vacina do vírus da febre amarela compreende uma cepa de vacina YF17D 17D-204, 17D-213 ou 17DD.
- 30 7. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o flavivírus quimérico compreende uma estrutura principal do vírus da febre amarela na qual as sequências codificando as proteínas de membrana e envelope do vírus da febre amarela foram substituídas com as sequências codificando as proteínas de membrana e envelope de um vírus sorotipo 1 do dengue.

8. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o flavivírus quimérico compreende uma estrutura principal do vírus da febre amarela na qual as sequências codificando as proteínas de membrana e envelope do vírus da febre amarela foram substituídas com as sequências 5 codificando as proteínas de membrana e envelope de um vírus sorotipo 2 do dengue.

9. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o flavivírus quimérico compreende uma estrutura principal do vírus da febre amarela na qual as sequências codificando as proteínas de membrana 10 e envelope do vírus da febre amarela foram substituídas com a sequência codificando as proteínas de membrana e envelope de um vírus sorotipo 3 do dengue.

10. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o flavivírus quimérico compreende uma estrutura principal do vírus da febre amarela na qual as sequências codificando as proteínas de membrana 15 e envelope do vírus da febre amarela foram substituídas com a sequência codificando as proteínas de membrana e envelope de um vírus sorotipo 4 do dengue.

11. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato 20 de que a vacina de flavivírus quimérico é uma vacina monovalente.

12. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a vacina de flavivírus quimérico é uma vacina tetravalente.

13. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende ainda administração de uma dose de reforço de uma 25 vacina de flavivírus quimérico, como definido na reivindicação 1, 6 meses a 10 anos após a primeira dose da vacina de flavivírus quimérico.

14. Kit, caracterizado pelo fato de que compreende:

- (i) uma vacina do vírus da febre amarela, e
- (ii) uma vacina de flavivírus quimérico compreendendo pelo menos um 30 flavivírus quimérico compreendendo uma estrutura principal do vírus da febre amarela onde a sequência codificando a proteína envelope do vírus da febre amarela foi substituída com a sequência codificando a pro-

teína envelope de um vírus do dengue.

15. Kit de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que o flavivírus quimérico compreende uma estrutura principal de vírus da febre amarela na qual as sequências codificando as proteínas de membrana 5 e envelope do vírus da febre amarela foram substituídas com as sequências codificando as proteínas de membrana e envelope de um vírus do dengue.

16. Kit de acordo com a reivindicação 14 ou 15, caracterizado pelo fato de que as proteínas envelope do dengue e/ou de membrana do dengue são proteínas "embaralhadas".

10 17. Kit de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que a vacina do vírus da febre amarela compreende uma cepa YF17D.

18. Kit de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que o flavivírus quimérico é composto de uma estrutura principal do vírus YF17D.

15 19. Kit de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que a vacina de flavivírus quimérico compreende um flavivírus quimérico 20 compreendendo uma estrutura principal do vírus da febre amarela na qual as sequências codificando as proteínas de membrana e envelope do vírus da febre amarela foram substituídas com as sequências codificando as proteínas de membrana e envelope de um vírus sorotipo 1 do dengue.

20 25 20. Kit de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que a vacina de flavivírus quimérico compreende um flavivírus quimérico compreendendo uma estrutura principal do vírus da febre amarela na qual as sequências codificando as proteínas de membrana e envelope do vírus da febre amarela foram substituídas com as sequências codificando as proteínas de membrana e envelope de um vírus sorotipo 2 do dengue.

30 21. Kit de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que a vacina de flavivírus quimérico compreende um flavivírus quimérico compreendendo uma estrutura principal do vírus da febre amarela na qual as sequências codificando as proteínas de membrana e envelope do vírus da febre amarela foram substituídas com as sequências codificando as proteínas de membrana e envelope de um vírus sorotipo 3 do dengue.

22. Kit de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que a vacina de flavivírus quimérico compreende um flavivírus quimérico compreendendo uma estrutura principal do vírus da febre amarela na qual as sequências codificando as proteínas de membrana e envelope do vírus da febre amarela foram substituídas com as sequências codificando as proteínas de membrana e envelope de um vírus sorotipo 4 do dengue.

5 23. Kit de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que compreende ainda pelo menos uma dose de reforço de uma vacina de flavivírus quimérico.

10 24. Uso de (i) uma dose de uma vacina do vírus da febre amarela e (ii) uma dose de uma vacina de flavivírus quimérico compreendendo pelo menos um flavivírus quimérico compreendendo uma estrutura principal do vírus da febre amarela na qual as sequências codificando a proteína envelope do vírus da febre amarela foram substituídas com sequências codificando 15 a proteína envelope de um vírus do dengue, caracterizado pelo fato de que é em indução de resposta imune de neutralização cruzada, de longa duração, para o vírus do dengue em um paciente, na qual a vacina de flavivírus quimérico é administrada pelo menos 30 dias e até 10 anos após a administração da vacina da febre amarela.

PI 0614265-6

## RESUMO

Patente de Invenção: "**USO DE UMA VACINA DO VÍRUS DA FEBRE AMARELA E DE UMA VACINA DE FLAVIVÍRUS QUIMÉRICO E KIT CONTENDO REFERIDAS VACINAS**".

- 5 A presente invenção refere-se a métodos e kits para uso em vacinação contra infecção pelo vírus do dengue.