



CIENCIAS BIOMÉDICAS

Premio Anual de la Academia de Ciencias de Cuba, 2019

Esquemas de inmunización complementaria basados en la combinación de una formulación tetravalente de proteínas recombinantes y virus vivos atenuados: estrategia vacunal contra el dengue

Iris Valdés^{1*} <http://orcid.org/0000-0002-7470-8349>
Lázaro Gil¹ <http://orcid.org/0000-0002-3042-8919>
Laura Lazo¹ <http://orcid.org/0000-0001-9130-6336>
Lisset Hermida¹ <http://orcid.org/0000-0001-8470-183X>
Gerardo Guillén¹ <http://orcid.org/0000-0003-3098-0970>
Alienys Izquierdo² <http://orcid.org/0000-0002-5822-8601>
Edith Suzarte¹ <http://orcid.org/0000-0002-5477-3362>
Karem Cobas¹ <http://orcid.org/0000-0001-9867-0501>
María G. Guzmán² <http://orcid.org/0000-0003-3927-0844>
Phuong Thao³
Hoang Anh Duc⁴
Phuong Yen³
Hoang Duc Loc⁴
Le Trung Dung³
Yusleidi Pérez¹ <http://orcid.org/0000-0002-5745-8835>
Rosa Ramírez² <http://orcid.org/0000-0001-6634-5341>
Mayling Álvarez² <http://orcid.org/0000-0002-8811-455X>
Yaremis Romero¹ <http://orcid.org/0000-0002-6737-4053>
Melyssa Yaugel¹ <http://orcid.org/0000-0001-5444-9135>
Ernesto Marcos¹
Do Tuan Dat⁴
Nguyen Dan Hien³
José Ángel Silva¹
Sonia González¹ <http://orcid.org/0000-0002-9052-024X>
Mariela Vázquez¹ <http://orcid.org/0000-0003-4812-4195>
Aina Méndez² <http://orcid.org/0000-0001-8142-1402>
Alejandro Martín¹ <http://orcid.org/0000-0002-7291-2274>

¹Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. La Habana, Cuba

²Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri. La Habana, Cuba

³Center for Research and Production of Vaccine and Biological. Polyvac, Vietnam

⁴Company for Vaccines and Biological Products. Vabiotech, Vietnam

*Autor para la correspondencia: iris.valdes@cigb.edu.cu

RESUMEN

Palabras clave

inmunización sensibilización/refuerzo; virus dengue; proteínas recombinantes; virus vivos atenuados; anticuerpos; respuesta inmunitaria mediada por células.

Introducción: El dengue es una de las enfermedades más importantes transmitida por mosquitos; sin embargo solo existe una vacuna licenciada, la cual está registrada en 20 países. Sin embargo, la vacuna no podrá ser administrada en niños menores de nueve años de edad, dado el elevado riesgo de hospitalización observado en este grupo etario. Por lo tanto, el desarrollo de nuevos candidatos vacunales y estrategias de inmunización continúan siendo una prioridad para la Organización Mundial de la Salud y la comunidad científica. Objetivos: el presente trabajo describe los resultados obtenidos de la combinación en esquemas com-



plementarios de dos tipos de candidatos vacunales: las proteínas recombinantes y los virus vivos atenuados. En un primer acercamiento, el candidato vacunal tetravalente Tetra DIIIC se administró en primates no humanos previamente infectados con virus dengue. En un segundo estudio se evaluó la combinación de Tetra DIIIC y la formulación tetravalente de virus vivos atenuados por vía molecular TV005, desarrollada por el Instituto de Salud de los Estados Unidos y licenciada a la compañía vietnamita Vabiotech. **Métodos:** Se utilizaron en los estudios primates no humanos sanos de la especie *Macaca mulatta*. El candidato vacunal tetravalente Tetra DIIIC, consiste en las proteínas recombinantes DIIIC-1-DIIIC4, correspondientes a los cuatro serotipos del virus dengue, adyuvadas en alúmina. La formulación tetravalente de virus vivos atenuados TV005 por Vabiotech incluyó las cepas virales DENV-1 Nauru/74 (WP), DENV-2 Tonga/74, DENV-3 Sleman/78 y DENV-4 Dominica/81. **Resultados:** Los resultados demuestran que la administración de Tetra DIIIC ocho meses después de la infección pudo activar la respuesta específica de las células B y T contra el DENV. Además, se demostró que los animales inoculados con Tetra DIIIC (una o dos dosis) y luego inmunizados con TV005 desarrollan una respuesta de anticuerpos protectora contra los cuatro serotipos del DENV y que la respuesta inmunológica generada por la Tetra DIIIC reduce la viremia LATV significativamente, lo cual pudiera reducir la reactividad que ha afectado a este último durante los ensayos clínicos. Los resultados aquí descritos resaltan la posibilidad de combinar nuestro candidato vacunal Tetra DIIIC con la vacuna tetravalente del virus vivo atenuado en una estrategia reforzada de inmunización. El presente estudio respalda las estrategias reforzadas como alternativa y enfoques promisorios que solucionan los problemas asociados a cada antígeno individual incluido en la combinación.

Complementary immunization schedules based on combination of a tetravalent formulation of recombinant proteins and attenuated live virus: vaccine strategy against dengue

ABSTRACT

Keywords

prime-boost immunization; dengue viruses (DENV); recombinant proteins; live-attenuated viruses, antibodies; cell-mediated immune response

Introduction: Dengue is one of the most important emerging diseases transmitted by mosquitoes; only one vaccine has been approved and licensed in 20 countries against DENV. This vaccine cannot be administered to children younger than 9 years, due to the increased risk of hospitalization observed in this age group. For this reason, the development of new vaccine candidates and/or immunization strategies continue to be a priority to the World Health Organization and the scientific community. Objectives: This work describes the results in prime-boost immunization schedules combining two different vaccine candidates: recombinant proteins and live attenuated vaccines. Firstly, we evaluated the capacity of Tetra DIIIC vaccine candidate to boost a memory immune response generated in DENV-immune monkeys and as a second study, we also evaluated in monkeys the combination of Tetra DIIIC with the LATV vaccine developed by NIAID and licensed to the Vietnamese company Vabiotech under the codename TV005. **Methods:** *Macaca mulatta* non-human primates were used in the studies. The tetravalent vaccine candidate Tetra DIIIC consists of recombinant proteins DIIIC-1-DIIIC4, corresponding to the four dengue virus serotypes, in adjuvant aluminum oxide. Tetravalent formulation of attenuated live viruses TV005 by Vabiotech included the virus strains DENV-1 Nauru/74 (WP), DENV-2 Tonga/74, DENV-3 Sleman/78, and DENV-4 Dominica/81. **Results:** Our results demonstrate that administration of Tetra DIIIC eight months after the infection was able to recall DENV specific memory B- and T-cell response. In addition, we demonstrate that animals primed with Tetra DIIIC (one or two doses) and later immunized with TV005 develop a neutralizing, protective antibody response against the four DENV serotypes, and that the immune response generated by Tetra DIIIC reduces LATV viremia significantly, which might reduce the reactivity that has afflicted the latter during clinical trials. Results described here highlight the possibility to combine our vaccine candidate Tetra DIIIC with live-attenuated tetravalent vaccine in a prime/boost strategy for immunizations. The present study supports the prime-boost strategies as alternative and promissory approaches solving the troubles associated with each individual antigen included in the combination.

INTRODUCCIÓN

El dengue es una de las enfermedades más importantes en términos de morbilidad y mortalidad humana. ⁽¹⁾ Se estima que más de 2000 millones de personas viven en áreas de riesgo; y que cada año ocurren alrededor de 390 millones de infecciones por dengue, de las cuales 96 millones manifiestan algún signo de severidad. ⁽²⁾ El agente etiológico de la enfermedad es un complejo viral, formado por los cuatro serotipos del virus del dengue (VDEN 1-4), ⁽³⁾ que se transmite al hombre por la picadura de un mosquito infectado con el virus, principalmente del género *Stegomyia*. ⁽⁴⁾ La infección por cualquiera de los cuatro serotipos virales puede ser asintomática, conllevar a la fiebre del dengue u ocasionar una forma más severa de la enfermedad conocida como dengue severo. ⁽⁵⁾

Actualmente solo existe una vacuna licenciada contra este patógeno, Dengvaxia®, desarrollada por la compañía Sanofi Pasteur, la cual está registrada en 20 países. ^(6, 7) Esta vacuna atenuada se obtuvo a través de la sustitución de los genes codificantes para las proteínas prM y E del virus 17D de la Fiebre Amarilla, por las proteínas equivalentes de los virus del dengue. ⁽⁸⁾ Los virus quiméricos resultantes (CYD) han demostrado ser inmunogénicos en humanos en términos de inducción de una respuesta de anticuerpos neutralizantes contra los cuatro serotipos virales; pero a su vez, inducen una baja respuesta inmunitaria celular debido a la carencia de las proteínas de la cápsida y las proteínas no estructurales 3 y 5, las cuales se han identificado como los principales blancos de la respuesta inmunitaria celular contra este patógeno. ^(9,10) Los recientes estudios de eficacia con Dengvaxia® demuestran que en áreas endémicas donde se ha administrado la vacuna, la tasa de hospitalización es mayor en las personas vacunadas, que la observada en personas que no han recibido la misma. ⁽¹¹⁾ Debido a estos resultados, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda la administración de la vacuna solo a personas mayores de nueve años de edad y en áreas con más de un 80 % de prevalencia de la enfermedad. ⁽¹²⁾

Por lo tanto, el desarrollo de nuevos candidatos vacunales y/o estrategias de inmunización continúan siendo una prioridad para la OMS y la comunidad científica. En estos momentos solo existen otros dos candidatos vacunales en estudios clínicos fase III y que también se basan en virus vivos atenuados. ⁽¹³⁻¹⁶⁾ Estos candidatos han demostrado ser seguros e inmunogénicos en humanos, pero tienen como desventajas fundamentales su reactogenicidad, la posibilidad de reversión a la virulencia y que se requieren generalmente de la administración de dos o tres dosis en esquemas de un año. ⁽¹⁷⁾ Además, su eficacia protectora aún está por demostrarse. Otros candidatos vacunales se basan en proteínas recombinantes, ⁽¹⁸⁻²¹⁾ que si bien no presentan estas desventajas por

ser antígenos que no se replican, son menos inmunogénicos y requieren del empleo de adyuvantes o su combinación con otros candidatos en esquema de inmunización complementarios, para desarrollar una respuesta inmunitaria eficaz.

MÉTODOS

Animales

Primates no humanos sanos de la especie *Macaca mulatta* obtenidos de la Isla Reu, perteneciente a Polyvac (Vietnam), mantenidos de acuerdo con las recomendaciones de la guía para el uso y cuidado de los animales de esta institución. Para los procedimientos, los animales fueron anestesiados con ketamina 10 mg/kg de peso corporal antes de las inmunizaciones y extracciones de sangre.

Cepas virales y proteínas recombinantes

Para las inmunizaciones de los animales, ensayos de neutralización y el experimento de reto viral se emplearon las cepas DENV-1 Jamaica (AF42562), DENV-2 SB8553 (FM986658), DENV-3 Nicaragua (FJ882576) y DENV-4 Dominica 814669 (AF326573), producidas en células Vero. La formulación tetravalente de proteínas recombinantes Tetra DIIIC incluyó 100 µg de las proteínas recombinantes DIIIC-1, DIIIC-2, DIIIC-3 y DIIIC-4 agregadas con el oligonucleótido inmunopotenciador (ODN 39M) y adyuvadas en alúmina a 1,44 mg/mL. Como placebo se empleó una formulación con iguales componentes, excepto las proteínas recombinantes. La formulación vacunal de virus vivos atenuados, se desarrollada por el NAID y licenciada a la compañía Vabiotech, incluyó las cepas virales DENV-1 Nauru/74 (WP), DENV-2 Tonga/74, DENV-3 Sleman/78 and DENV-4 Dominica/81.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este trabajo recoge los resultados de dos estudios realizados en primates no humanos que demuestran la posibilidad de combinar en esquemas de inmunización complementaria dos tipos de candidatos vacunales, la formulación basada en proteínas recombinantes Tetra DIIIC y el candidato de virus vivos atenuados TV005.

En un primer estudio, tres grupos de primates no humanos se inocularon con cepas infectivas de VDEN-1, VDEN-3 o VDEN-4 (10^3 PFU o 10^4 PFU), respectivamente y se comprobó la replicación viral a través de la detección de viremia por aislamiento viral en células Vero. Como resultado se detectó viremia en los animales inoculados con cada uno de los virus, con una media de duración de 4,7 días, 3,0 días o 4,0 días, respectivamente. Ocho meses después de esta infección, los animales recibieron una inmunización complementaria con el candidato vacunal cubano tetravalente de proteínas recom-

binantes Tetra DIIIC. Antes y después de esta dosis a los animales se les realizaron extracciones de sangre para evaluar la respuesta inmunitaria humoral y celular inducida. La respuesta de anticuerpos antivirales se determinó por un ELISA indirecto contra los cuatro serotipos virales. Como resultado, todos los animales en el día 0 (día de la administración de la formulación Tetra DIIIC), mostraron títulos de anticuerpos antivirales contra los cuatro serotipos, independientemente del serotipo viral inoculado previamente. Treinta días después la dosis complementaria con la formulación Tetra DIIIC, se observó un incremento significativo en la respuesta de anticuerpos antivirales (Figura 1).

Adicionalmente, la funcionalidad de estos anticuerpos se evaluó a través de un ensayo de neutralización viral *in vitro* (PRNT) en células Vero contra cada serotipo viral. Igualmente, se observó un incremento en la respuesta de anticuerpos neutralizantes después de administrada la formulación Tetra DIIIC, independientemente del serotipo empleado durante la infección viral (Figura 2). Estos resultados sugieren que la región del DIII incluido en las proteínas recombinantes DIIIC es capaz de llamar a las células B memoria específicas para esta región y que se generan durante la infección viral, lo cual soporta la potencialidad de utilizar este fragmento viral en candidatos vacunales basados en proteínas recombinantes y además sugiere que la formulación Tetra DIIIC podría ser administrada en individuos positivos a VDEN, con la finalidad de incrementar la madurez y afinidad de la respuesta inmunitaria humoral, evitando así posibles complicaciones típicas de las infecciones secundarias o terciarias con un serotipo heterólogo.

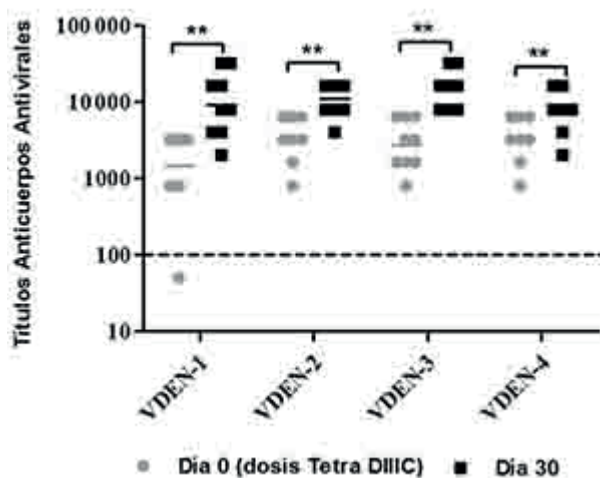


Fig. 1. Respuesta de anticuerpos antivirales. Nueve monos rhesus se inocularon con VDEN-1, VDEN-3 o VDEN-4, y 8 meses después se les administró una dosis de Tetra DIIIC. La respuesta de anticuerpos se determinó por ELISA en los días 0 y 30 tras la dosis de Tetra DIIIC. Los datos representan la media geométrica de los títulos de anticuerpos de dos experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó por una prueba de Wilcoxon (**: $P < 0,01$). La línea de puntos representa el valor de positividad.

La capacidad de la inmunización complementaria con la formulación Tetra DIIIC de llamar la respuesta inmunitaria celular previamente generada por la infección viral, se evaluó a través de la medición de los niveles de $IFN\gamma$ en los sobrenadantes de cultivos de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de los animales, tras la estimulación *in vitro* con los antígenos virales, el día de la dosis con Tetra DIIIC y 30 días posteriores a la inmunización. De forma similar a lo obtenido en la evaluación de la respuesta inmunitaria humoral, la respuesta inmunitaria celular se incrementó significativamente después de la administración de la formulación Tetra DIIIC (Figura 3). El papel antiviral del $IFN\gamma$ contra los VDEN está ampliamente demostrado y la secreción de esta citocina correlaciona con la protección y el estado subclínico de la enfermedad. Los resultados muestran que la formulación Tetra DIIIC es capaz de reforzar también la inmunidad mediada por células, previamente generada por la infección viral, lo cual avala el empleo de la proteína de la cápsida, identificada como el principal blanco de la respuesta de linfocitos T CD4+ citotóxicos y productores de $IFN\gamma$ que se generan durante una infección natural. La proteína de la cápsida está incluida en las proteínas DIIIC por lo tanto, la formulación Tetra DIIIC contiene epítomos para este subgrupo de células T las cuales son eficientemente llamadas tras la administración de la formulación.

En un segundo estudio en primates no humanos, se evaluó la combinación de Tetra DIIIC y la formulación tetravalente de virus vivos atenuados por vía molecular TV005, desarrolla-

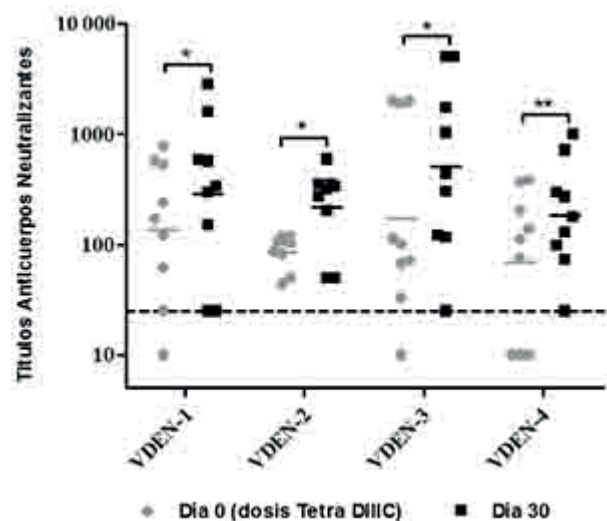


Fig. 2. Respuesta de anticuerpos neutralizantes. Nueve monos rhesus se inocularon con VDEN-1, VDEN-3 o VDEN-4, y 8 meses después se les administró una dosis de Tetra DIIIC. La respuesta de anticuerpos se determinó por PRNT en los 0 días y 30 días tras la dosis de Tetra DIIIC. Los datos representan la media geométrica de los títulos de anticuerpos de dos experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó por una prueba de Wilcoxon (*: $P < 0,05$, **: $P < 0,01$). La línea de puntos representa el valor de positividad.

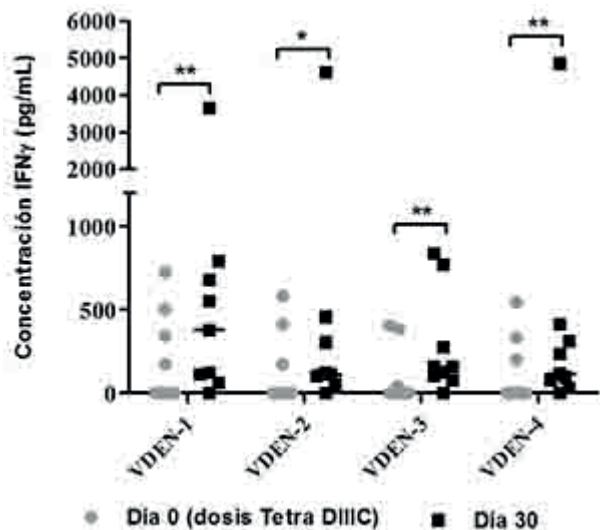


Fig. 3. Respuesta inmunitaria celular. Nueve monos rhesus se inocularon con VDEN-1, VDEN-3 o VDEN-4, y 8 meses después se les administró una dosis de Tetra DIIC. El día de la dosis y 30 días después, los PBMC de los animales se estimularon *in vitro* con cada VDEN y se determinaron las concentraciones de IFN γ por ELISA. El análisis estadístico se realizó por una prueba de Wilcoxon (*:P < 0,05, **:P < 0,01).

da por el Instituto de Salud de los Estados Unidos y licenciada a la compañía vietnamita Vabiotech. Los monos rhesus se dividieron en cuatro grupos, dos grupos se inocularon con las combinaciones de una o dos dosis de Tetra DIIC y posteriormente una dosis del candidato TV005. Un tercer grupo de animales recibió solamente la formulación TV005 y un cuarto grupo se inoculó con una formulación placebo. Luego de las inmunizaciones, a los animales se les determinó la respuesta inmunitaria humoral inducida, en términos de respuesta de anticuerpos antivirales y neutralizantes. En la figura 4 se muestran los títulos de anticuerpos neutralizantes medidos por PRNT contra cada serotipo viral.

Como se observa en la figura 4, en el Día 90 (un mes tras la última dosis con la formulación Tetra DIIC), solo los animales que recibieron dos dosis de Tetra DIIC tuvieron respuesta de anticuerpos neutralizantes *in vitro* a los cuatro serotipos virales. Sin embargo, luego de la administración de la formulación TV005, se observó un refuerzo en la respuesta de anticuerpos neutralizantes a los serotipos 1, 2 y 4 solo en los animales inmunizados con una dosis de Tetra DIIC. Los animales que se inocularon con dos dosis de Tetra DIIC incrementaron los títulos de anticuerpos neutralizantes solo para el serotipo 4. Aunque en este ensayo no se encontró una diferencia cuantitativa en los niveles de anticuerpos neutralizantes generados entre los grupos que recibieron la combinación Tetra DIIC/TV005 y el grupo que recibió una única inmunización con TV005, probablemente la naturaleza diferente de ambos in-

munógenos debe tener un efecto en la respuesta inmunitaria humoral inducida, en cuanto a la diversidad de epítomos presentados y la madurez de la afinidad de estos anticuerpos.

Adicionalmente, tras la administración del candidato vacunal TV005, se evaluó en este estudio la capacidad de replicación de las cepas virales atenuadas mediante la titulación en células Vero, en los 10 días posteriores a dicha inoculación. Como resultado, en los animales inoculados con una dosis de TV005 se detectó una viremia de corta duración de 1 día a 2 días para los serotipos VDEN-1, VDEN-2 y VDEN-4, con títulos de $10^{1.6}$ PFU/mL a $10^{2.1}$ PFU/mL. Los niveles de viremia obtenidos fueron similares a los reportados en humanos inmunizados con este candidato vacunal. Para el serotipo 3 no se detectó viremia probablemente debido a la prevalencia de inmunidad a este serotipo en los animales inmunizados. En los animales inmunizados con la formulación Tetra DIIC, con una o dos dosis, interesantemente se observó una reducción significativa en los niveles de replicación de las cepas virales que componen la formulación TV005 (Tabla 1).

Finalmente se evaluó la capacidad protectora de la combinación Tetra DIIC/TV005 administrada en un régimen de inmunización complementario 77 días después de la última inmunización. Para este experimento los grupos 2xDIIC+TV005 y Placebo se dividieron en cuatro subgrupos y se retó cada uno con un serotipo viral diferente. En el caso de los grupos inmunizados solo con TV005 y una dosis de Tetra DIIC, debido al bajo número de animales incluidos, solo se realizó el reto viral con el VDEN-2.

Como se muestra en la figura 5, todos los animales del grupo Placebo mostraron viremias detectables tras el reto viral, con una duración media de 4,5 días, 3,75 días, 2,75 días y 3,0 días, 67,0 días para VDEN-1, VDEN-2, VDEN-3 y VDEN-4, respectivamente (Figura 5).

En los grupos inmunizados con una o dos dosis de Tetra DIIC y posteriormente con la formulación TV005, aunque la viremia vacunal fue indetectable (Tabla 1), los animales resultaron protegidos tras el reto viral infeccioso (Figura 5). Estos resultados nos sugieren que, aunque la inmunización con Tetra DIIC reduce la capacidad de replicación de los virus que conforman el candidato vacunal atenuado TV005, existe aún un bajo nivel de replicación, indetectable por las técnicas analíticas empleadas, que es suficiente para reforzar la inmunidad previamente generada por la inmunización con la formulación Tetra DIIC y esta respuesta inmunitaria es capaz de proteger frente al reto viral. Así la reducción de la replicación del candidato atenuado TV005, producida por la administración de la Tetra DIIC tiene implicaciones clínicas importantes, debido a que esta formulación recombinante puede representar una solución potencial a los problemas de reactividad aso-

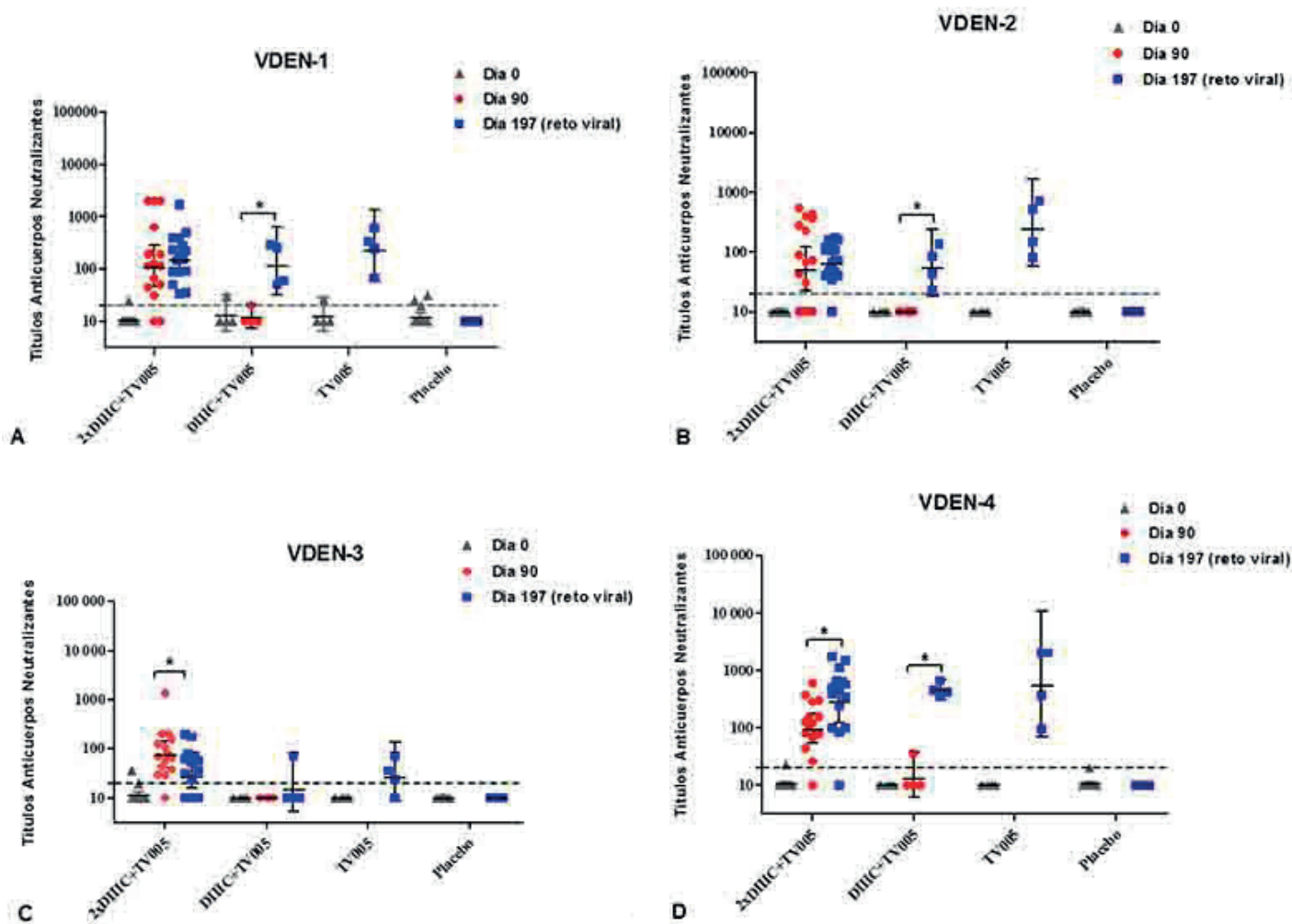


Fig. 4. Respuesta de anticuerpos neutralizantes contra virus dengue en monos inmunizados con la combinación Tetra DIIC/TV005. Las muestras de sueros obtenidas antes de la inmunización (día 0), un mes después de la última dosis (día 90) y en el momento del reto (día 197) se evaluaron por PRNT en células Vero. (A) Anticuerpos neutralizantes contra VDEN-1. (B) Anticuerpos neutralizantes contra VDEN-2. (C) Anticuerpos neutralizantes contra VDEN-3. (D) Anticuerpos neutralizantes contra VDEN-4. La línea discontinua representa el valor de positividad. Los Día 90 y Día 197 se compararon utilizando la prueba de Wilcoxon (*:p < 0,05).

Tabla 1. Viremia producida por los virus vivos atenuados de la formulación vacunal TV005 administrada en el día 120.

Grupo	Animales	Viremia vacunal (Log10 PFU/mL)			
		[duración; día]			
		V DEN-1	V DEN-2	V DEN-3	V DEN-4
2xDIIC+TV005	n = 16	nd **	nd *	nd	nd **
DIIC+TV005	n = 4	nd **	nd *	nd	nd **
TV005	1	nd	nd	nd	nd
	2	nd	nd	nd	nd
	3	1,75 [2; 122, 123]	nd	nd	2,10 [2; 123, 124]
	4	1,65 [1; 122]	1,60 [1; 123]	nd	1,60 [1; 124]

La carga viral se determinó por aislamiento viral en células Vero, empleando anticuerpos específicos contra cada serotipo viral. La viremia se comparó entre los grupos empleando una prueba de Kruskal-Wallis y una prueba *a posteriori* de Dunn, en dos experimentos independientes (*: p < 0,05; **: p < 0,01). nd: no detectada (<1).

ciados a los candidatos vacunales vivos atenuados como lo es la formulación TV005. Además, la formulación Tetra DIIIC tiene como ventaja la capacidad de reducir la replicación del candidato TV005, sin afectar la inmunogenicidad del mismo, como se observó en las condiciones experimentales examinadas en este estudio. La combinación Tetra DIIIC/TV005 representa una alternativa atractiva para el desarrollo y evaluación clínica de candidatos vacunales administrados de forma complementaria. Esta combinación podría incrementar el perfil de seguridad de la vacuna TV005 y además potenciar la respuesta inmunitaria con el objetivo de evitar los eventos severos asociados a las infecciones con los VDEN.

Conclusiones

Los resultados presentados en este trabajo constituyen la prueba de concepto de estrategias de inmunización comple-

mentarias contra los virus dengue, combinando las proteínas recombinantes del candidato vacunal cubano Tetra DIIIC y virus vivos o una formulación tetravalente de virus vivos atenuados (TV005). La novedad principal de este trabajo, con respecto a trabajos previos presentados a la Academia de Ciencias de Cuba, es la demostración por primera vez, de que la formulación tetravalente Tetra DIIIC es capaz de reforzar la respuesta inmunitaria humoral y celular inducida en primates no humanos por virus infectivos. Además, la formulación Tetra DIIIC también es capaz de generar una respuesta inmunitaria humoral funcional que reduce la viremia producida por un candidato vacunal de virus vivos atenuados, sin afectarse la capacidad protectora de la combinación ante el reto viral. Estos resultados avalan el empleo de la formulación Tetra DIIIC en esquemas de inmunización complementaria, tanto

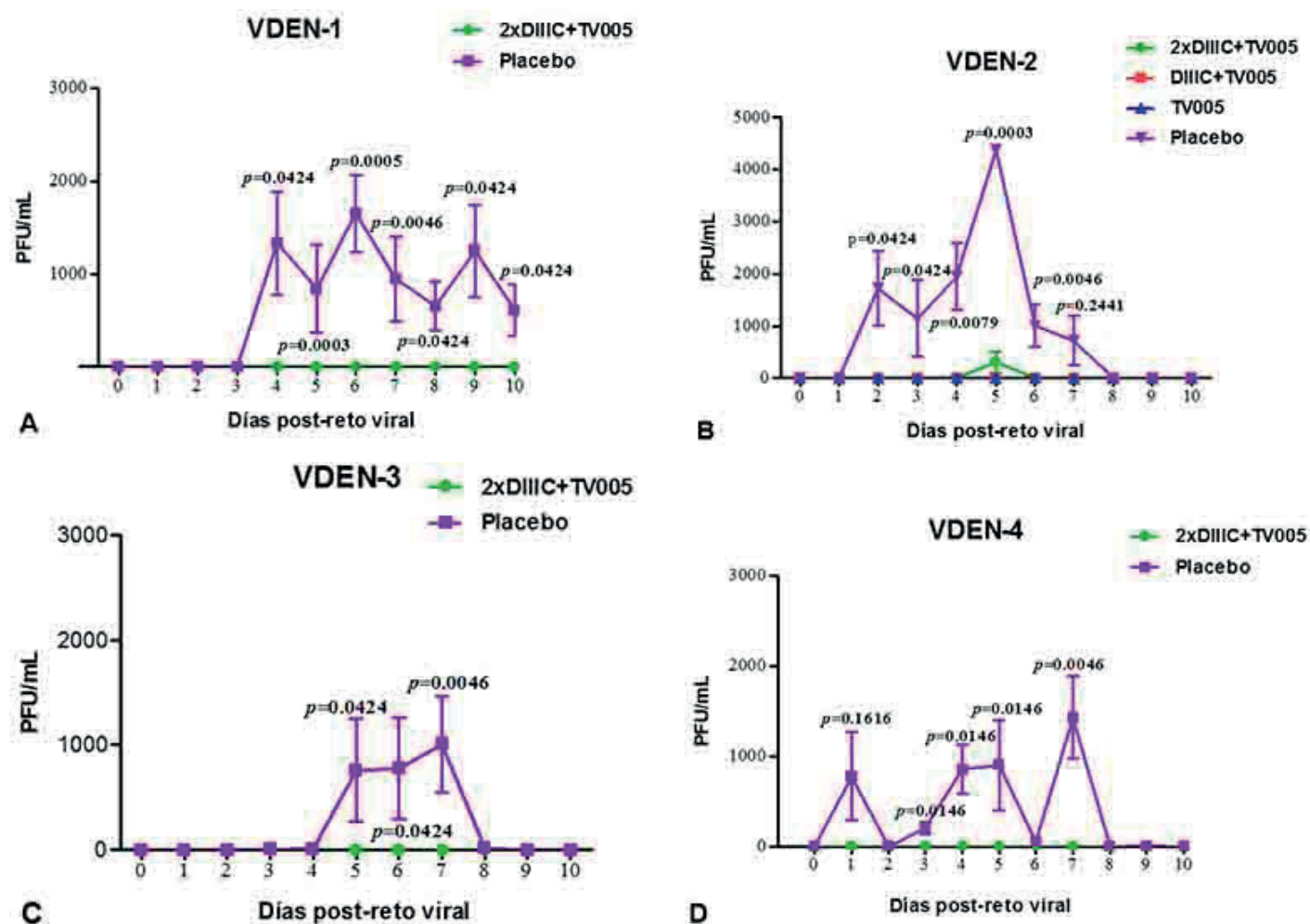


Fig. 5. Viremia tras el reto viral en primates no humanos inmunizados con la combinación Tetra DIIIC/TV005. Los monos se retaron con 10^3 PFU de cada VDEN, 77 días después de las inmunizaciones (día 197). Las muestras de sueros se colectaron diariamente y la viremia se determinó por aislamiento en células Vero. Los gráficos representan el curso temporal de los títulos virales promedio de cada grupo, inoculado con igual serotipo viral ($n = 3$ o $n = 4$). Los datos representan la media \pm error estándar de la media de dos experimentos independientes. El límite de detección del ensayo es 10 PFU/mL. Los títulos virales se analizaron por una prueba de Mann-Whitney, comparando los valores de los animales Placebo y animales vacunados.

para incrementar la respuesta inmunitaria generada por una infección viral o para limitar la reactogenicidad asociada a la replicación de candidatos vacunales basados en virus vivos atenuados. Ante la expansión global de este patógeno humano y su vector trasmisor, así como la no disponibilidad de una vacuna preventiva, segura y eficaz, o de un tratamiento antiviral para los individuos infectados, la presente estrategia representa una alternativa vacunal muy atractiva.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kyle JL and Harris E. Global spread and persistence of dengue. *Annu.Rev.Microbiol.* 2008; (62):71-92.
2. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, Drake JM, Brownstein JS, Hoen AG, Sankoh O, Myers MF, George DB, Jaenisch T, Wint GR, Simmons CP, Scott TW, Farrar JJ, and Hay SI. The global distribution and burden of dengue. *Nature* (2013); (496):504-7.
3. Gubler DJ. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol.* 2002; (10):100-3.
4. Halstead, S. 2008. *Dengue*. Imperial College Press, London.
5. Halstead SB. *Dengue*. *Lancet* 2007; (370):1644-52.
6. Russell PK and Halstead SB. Challenges to the Design of Clinical Trials for Live-Attenuated Tetravalent Dengue Vaccines. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 2016; (10):e0004854.
7. Feinberg MB and Ahmed R. Advancing dengue vaccine development. *Science* 2017; (358):865-6.
8. Guy B, Briand O, Lang J, Saville M, and Jackson N. Development of the Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine: One more step forward. *Vaccine* . 2015;(33):7100-1.
9. Weiskopf D, Angelo MA, de Azeredo EL, Sidney J, Greenbaum JA, Fernando AN, Broadwater A, Kolla RV, De Silva AD, de Silva AM, Mattia KA, Doranz BJ, Grey HM, Shrestha S, Peters B, and Sette A. Comprehensive analysis of dengue virus-specific responses supports an HLA-linked protective role for CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* .2013; (110):E2046-53.
10. Weiskopf D, Angelo MA, Grifoni A, O'Rourke PH, Sidney J, Paul S, De Silva AD, Phillips E, Mallal S, Premawansa S, Premawansa G, Wijewickrama A, Peters B, and Sette A. HLA-DRB1 Alleles Are Associated With Different Magnitudes of Dengue Virus-Specific CD4+ T-Cell Responses. *J.Infect Dis.*2016;(214):1117-24.
11. Hadinegoro SR, Arredondo-Garcia JL, Capeding MR, Deseda C, Chotpitayasunondh T, Dietze R, Muhammad Ismail HI, Reynales H, Limkittikul K, Rivera-Medina DM, Tran HN, Bouckennooghe A, Chansinghakul D, Cortes M, Fanouillere K, Forrat R, Frago C, Gailhardou S, Jackson N, Noriega F, Plennevaux E, Wartel TA, Zambrano B, and Saville M. Efficacy and Long-Term Safety of a Dengue Vaccine in Regions of Endemic Disease. *N.Engl.J.Med* 2015;(373):1195-206.
12. Wilder-Smith A. Serostatus-dependent performance of the first licensed dengue vaccine: implications for travellers. *J.Travel.Med* 2018;(25).
13. Durbin AP, Kirkpatrick BD, Pierce KK, Carmolli MP, Tibery CM, Grier PL, Hynes N, Opert K, Jarvis AP, Sabundayo BP, McElvany BD, Sendra EA, Larsson CJ, Jo M, Lovchik JM, Luke CJ, Walsh MC, Fraser EA, Subbarao K, and Whitehead SS. A 12-Month-Interval Dosing Study in Adults Indicates That a Single Dose of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Tetravalent Dengue Vaccine Induces a Robust Neutralizing Antibody Response. *J.Infect. Dis.* 2016.
14. Osorio JE, Wallace D, and Stinchcomb DT. A recombinant, chimeric tetravalent dengue vaccine candidate based on a dengue virus serotype 2 backbone. *Expert.Rev.Vaccines.* 2016; (15):497-508.
15. Rupp R, Luckasen GJ, Kirstein JL, Osorio JE, Santangelo JD, Raanan M, Smith MK, Wallace D, Gordon GS, and Stinchcomb DT. Safety and immunogenicity of different doses and schedules of a live attenuated tetravalent dengue vaccine (TDV) in healthy adults: A Phase 1b randomized study. *Vaccine* .2015;(33):6351-9.
16. Osorio JE, Velez ID, Thomson C, Lopez L, Jimenez A, Haller AA, Silengo S, Scott J, Boroughs KL, Stovall JL, Luy BE, Arguello J, Beatty ME, Santangelo J, Gordon GS, Huang CY, and Stinchcomb DT. Safety and immunogenicity of a recombinant live attenuated tetravalent dengue vaccine (DENVax) in flavivirus-naive healthy adults in Colombia: a randomised, placebo-controlled, phase 1 study. *Lancet Infect Dis.* 2014;(14):830-8.
17. Screaton G and Mongkolsapaya J. Which Dengue Vaccine Approach Is the Most Promising, and Should We Be Concerned about Enhanced Disease after Vaccination? The Challenges of a Dengue Vaccine. *Cold Spring Harb.Perspect.Biol.* 2018;(10)
18. Simmons M, Murphy GS, Kochel T, Raviprakash K, and Hayes CG. Characterization of antibody responses to combinations of a dengue-2 DNA and dengue-2 recombinant subunit vaccine. *Am.J. Trop.Med.Hyg.* 2001;(65):420-6.
19. Simmons M, Porter KR, Hayes CG, Vaughn DW, and Putnak R. Characterization of antibody responses to combinations of a dengue virus type 2 DNA vaccine and two dengue virus type 2 protein vaccines in rhesus macaques. *J.Virol.* 2006;(80):9577-85.
20. Valdes I, Hermida L, Martin J, Menendez T, Gil L, Lazo L, Castro J, Niebla O, Lopez C, Bernardo L, Sanchez J, Romero Y, Martinez R, Guzman MG, and Guillen G. Immunological evaluation in non-human primates of formulations based on the chimeric protein P64k-domain III of dengue 2 and two components of *Neisseria meningitidis*. *Vaccine* . 2009; (27):995-1001.
21. Valdes I, Gil L, Romero Y, Castro J, Puente P, Lazo L, Marcos E, Guzman MG, Guillen G, and Hermida L. The chimeric protein domain III-capsid of dengue virus serotype 2 (DEN-2) successfully boosts neutralizing antibodies generated in monkeys upon infection with DEN-2. *Clin Vaccine Immunol* .2011;(18):455-9.

Recibido: 28/04/2020

Aprobado: 10/07/2020

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflictos de intereses en relación al trabajo de investigación presentado.

Contribución de autoría

1. Conceptualización: Lázaro Gil, Iris Valdés, Laura Lazo, Lisset Hermida, Gerardo Guillén, Do Tuan Dat, Nguyen Dan Hien
2. Curación de datos: Lázaro Gil, Iris Valdés, Laura Lazo
3. Análisis formal: Lázaro Gil, Iris Valdés, Laura Lazo

4. Adquisición de fondos: Lázaro Gil, Lisset Hermida, Gerardo Guillén, Do Tuan Dat, Nguyen Dan Hien
5. Investigación: Iris Valdés, Lázaro Gil, Laura Lazo, Lisset Hermida, Gerardo Guillén, Alienys Izquierdo, Edith Suzarte, Karem Cobas, María G. Guzmán, Phuong Thao, Hoang Anh Duc, Phuong Yen, Hoang Duc Loc, Le Trung Dung, Yusleidi Pérez, Rosa Ramírez, Mayling Álvarez, Yaremis Romero, Melyssa Yaugel, Ernesto Marcos, Do Tuan Dat, Nguyen Dan Hien, José Ángel Silva, Sonia González, Mariela Vázquez, Alejandro Martín
6. Metodología: Lázaro Gil, Iris Valdés, Laura Lazo, Lisset Hermida, Gerardo Guillén
7. Administración del proyecto: Lázaro Gil, Lisset Hermida, Gerardo Guillén, María G. Guzmán, Do Tuan Dat, Nguyen Dan Hien
8. Recursos: Lázaro Gil, Lisset Hermida, Gerardo Guillén, María G. Guzmán, Do Tuan Dat, Nguyen Dan Hien
9. *Software*: -
10. Supervisión: Lázaro Gil, Lisset Hermida, Gerardo Guillén, María G. Guzmán, Do Tuan Dat, Nguyen Dan Hien
11. Validación: Iris Valdés, Lázaro Gil, Laura Lazo, Lisset Hermida, Gerardo Guillén, Alienys Izquierdo, Edith Suzarte, Karem Cobas, María G. Guzmán, Do Tuan Dat, Nguyen Dan Hien
12. Visualización: Lázaro Gil, Iris Valdés
13. Redacción (borrador original): Lázaro Gil, Iris Valdés, Laura Lazo
14. Redacción (revisión y edición): Lázaro Gil, Iris Valdés, Laura Lazo, Alejandro Martín

Financiación

La investigación realizada recibió financiación del programa cubano para el desarrollo de la vacuna contra el dengue.

Cómo citar este artículo

Valdés I, Gil L, Lazo L, Hermida L, Guillén G, Izquierdo A, et al. Esquemas de inmunización complementaria basados en la combinación de una formulación tetravalente de proteínas recombinantes y virus vivos atenuados: estrategia vacunal contra el dengue. *Anales de la Academia de Ciencias de Cuba* [Internet]. 2021 [citado en día, mes, año]; 11(2):e822. Disponible en: <http://www.revistaccuba.cu/index.php/revacc/article/view/822>

