

Demostración de la capacidad protectora de candidatos vacunales contra el virus del dengue basados en la proteína de la cápsida y el oligodesoxinucleótido 39M

Autoría principal

Ernesto Marcos¹, Lázaro Gil¹, Lisset Hermida¹, Alienys Izquierdo², Gerardo Guillén¹, María Guadalupe Guzmán², Laura Lazo¹, Iris Valdés¹.

Otros autores

Mayling Álvarez², Edith Suzarte¹, Rosa Ramírez², Jorge Castro¹, Yusleidi Pérez¹, Karem Cobas¹, José Ángel Silva¹, Yaremis Romero¹, Karelía Cosme¹, Emma Brown¹, Aracelys Blanco¹, Jamilet Miranda¹, Yasser Perera¹.

Colaboradores

Jorge Martín, Ricardo Silva, Darién García, Regla Estrada, Omar Gell, Alexander Hernández, Yanuaries Castanedo, Dayana Labrada, Tania Cárdenas, Alberto Tamayo, Sarah Clark, Yanara Ibáñez, Joaquín R. Lorenzo, Isela García, Oney Ortega, María del J. Leal, Abel Paredes, Estela Prieto, Yamina Muñoz, Adrián Castellanos, Ignacio Rodríguez.

Entidades ejecutoras principales

¹Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB).

Entidades participantes

²Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” (IPK).

Autor para correspondencia

Ernesto Marcos López

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB).

Ave. 31 e/ 158 y 190, Cubanacán, Playa. PO Box. 6162, Ciudad de la Habana 10600, Cuba.

Telf.: 7271 6022, Fax: 7271 4764.

E-mail: ernesto.marcos@cigb.edu.cu

Aporte científico de cada autor al resultado

- ✓ **Ernesto Marcos** (10%): Diseño y realización de los experimentos en ratones. Análisis de todos los resultados obtenidos. Autor principal de una de las publicaciones relacionadas con este trabajo
- ✓ **Lázaro Gil** (10%): Diseño y realización de los experimentos en ratones y monos. Análisis de todos los resultados obtenidos. Autor principal de dos de las publicaciones relacionadas con este trabajo
- ✓ **Lisset Hermida** (10%): Líder científica del proyecto. Participación en la elaboración de la estrategia del proyecto y en los diseños experimentales. Seguimiento de las tareas y aporte de ideas.
- ✓ **Alienys Izquierdo** (7%): Participación en los ensayos realizados en ratones y monos. Análisis de los resultados obtenidos.
- ✓ **Gerardo Guillén** (7%): Dirección del proyecto en el CIGB. Participación en la elaboración de la estrategia del proyecto. Seguimiento de las tareas.

- ✓ **Guadalupe Guzmán** (7%): Jefa del proyecto. Seguimiento y control de las tareas. Discusión de resultados.
- ✓ **Laura Lazo** (7%): Participación en los ensayos realizados en ratones y monos. Análisis de los resultados obtenidos.
- ✓ **Iris Valdés** (17%): Participación en la evaluación inmunológica de los agregados de las proteínas en ratones y monos. Análisis de todos los resultados obtenidos.
- ✓ **Mayling Álvarez** (5%): Evaluación de la respuesta inmune humoral neutralizante inducida por los agregados de la proteína DIIC-2 en ratones y monos.
- ✓ **Edith Suzarte** (5%): Participación en los experimentos de evaluación de la respuesta inmune generada por ambas proteínas en ratones.
- ✓ **Rosa Ramírez** (3%): Evaluación de la respuesta inmune humoral neutralizante inducida por los agregados de la proteína DIIC-2 en ratones y monos.
- ✓ **Jorge Castro** (3%): Desarrollo de los esquemas de inmunización en monos.
- ✓ **Yusleidi Pérez** (3%): Experimentos de expresión de la proteína recombinante DIIC-2.
- ✓ **Karem Cobas** (3%): Experimentos de expresión de la proteína recombinante C-2.
- ✓ **José Ángel Silva** (2%): Síntesis de los oligonucleótidos empleados en los estudios.
- ✓ **Yaremis Romero** (2%): Participación en los ensayos de medición de respuesta neutralizante y aislamiento viral en cultivo de células.
- ✓ **Karelia Cosme** (2%): Desarrollo de los esquemas de inmunización en monos.
- ✓ **Enma Brown** (2%): Desarrollo de los esquemas de inmunización en ratones.
- ✓ **Aracelys Blanco** (2%): Desarrollo de los esquemas de inmunización en ratones.
- ✓ **Jamilet Miranda** (1%): Análisis estadísticos de los resultados.
- ✓ **Yasser Perera** (1%): Análisis estadísticos de los resultados.

Resumen

El proyecto cubano para el desarrollo de una vacuna contra el dengue se focaliza en la generación de una vacuna por subunidades basada en proteínas recombinantes que incluyen el dominio III de la proteína envoltura viral y/o la proteína de la cápsida. De esta forma se han obtenido las proteínas DIIC-2 (dominio III de la envoltura de dengue-2 fusionado al extremo N-terminal de la proteína de la cápsida del mismo serotipo) y C-2 (proteína de la cápsida de dengue-2) basados en la potencialidad del dominio III para la inducción de una respuesta humoral neutralizante y la potencialidad de la cápsida para la generación de respuesta celular.

En el año 2009 se demostró que ambas proteínas fueron capaces de formar agregados al ser incubadas con una mezcla aleatoria de oligodeoxinucleótidos (ODNs), y que solo estas formas agregadas indujeron una respuesta inmune funcional en ratones. Teniendo en cuenta que los ODNs contienen secuencias inmunoestimuladoras, la selección adecuada de estos últimos puede ser determinante en el patrón de respuesta inmune y en la capacidad protectora del preparado vacunal.

En el presente trabajo se evaluaron en ratones preparaciones de la proteína DIIIC-2 agregada con diferentes ODNs de conocida capacidad potenciadora y sin modificación química, incluyendo además una nueva variante, el ODN 39M, que combina en una misma molécula regiones CpG para ratones, monos y humanos. Los resultados revelaron que independientemente del ODN empleado en la agregación de DIIIC-2, la proteína fue capaz de inducir, en presencia de alúmina, una respuesta de anticuerpos neutralizantes. Sin embargo, la secuencia del ODN sí determinó el patrón de respuesta inmune generado (relación IgG1/IgG2a y IFN γ /IL-4) ya que solamente el ODN 39M indujo un patrón de respuesta Th1 semejante al que se induce tras la infección viral en ratones. Basado en este hallazgo, se seleccionó el ODN 39M para la agregación de las moléculas C-2 y DIIIC-2, las cuales en presencia de alúmina, indujeron protección frente al reto viral en dos modelos animales de ratones así como en primates no humanos. Es la primera vez que se demuestra a nivel mundial la capacidad protectora de la preparación DIIIC-2/ODNM39 tanto en ratones transgénicos que desarrollan síntomas similares al dengue como en primates no humanos (PNH). Adicionalmente, los niveles de protección alcanzados en PNH con la preparación C-2/ODN M39 evidenciaron por primera vez en este modelo animal, la funcionalidad de una respuesta inmune independiente de Acs neutralizantes contra el virus dengue. Los resultados obtenidos en este trabajo sustentan el papel inmunoestimulador del ODN M39 en la inmunogenicidad de un antígeno heterólogo, lo cual permite no solo emplearlo en preparaciones vacunales contra el dengue, la enfermedad viral transmitida por artrópodos de mayor difusión que afecta a la población humana, sino también en preparaciones con otras moléculas con capacidad de agregación por el mismo tipo de interacción proteína-ODN y sin excluir la alúmina como adyuvante convencional para la inducción de respuesta inmune humoral.

Comunicación corta

Introducción

El Dengue es la enfermedad viral transmitida por artrópodos más ampliamente difundida que afecta a la población humana. El agente causal de esta enfermedad es el virus dengue (VD), perteneciente a la familia *Flaviviridae*, género *Flavivirus*, el cual se transmite por la picada del mosquito *Aedes aegypti*. Debido al serio problema médico que constituye el Dengue, la OMS ha designado a este virus como uno de los cinco blancos de alta prioridad para el desarrollo de vacunas. Aunque varias estrategias están en investigación para el desarrollo de un candidato efectivo y seguro, hasta la fecha ninguna estrategia ha demostrado ser completamente satisfactoria. El candidato más avanzado en el mundo se corresponde con virus quiméricos atenuados, con resultados preliminares de eficacia inferiores al 60%. Teniendo en cuenta además la posibilidad de reversión y los esquemas largos de vacunación, requeridos la variante de una formulación basada en proteínas recombinantes constituye una alternativa atractiva, especialmente para niños menores de un año de edad, grupo de riesgo que no podrá recibir una vacuna viva atenuada.

El proyecto cubano para el desarrollo de una vacuna contra este patógeno trabaja en la obtención de subunidades recombinantes, que incluyen dos regiones virales: el dominio III de la proteína de la envoltura viral y la proteína de la cápsida. El dominio III se ha

relacionado con la presencia de epitopos para anticuerpos neutralizantes además de constituir la región de unión al receptor celular. Por otro lado, se han identificado varios clones de células T que reconocen epitopos de la proteína de la cápsida en individuos con infecciones naturales. Además, como ninguna de las regiones de la nucleocápsida viral están expuestas en la superficie del virión maduro, esta proteína tiene la potencialidad de inducir una respuesta inmune celular, sin la contribución de anticuerpos antivirales. Por último, teniendo en cuenta la función biológica de la cápsida de englobar el ARN viral, esta proteína podría formar agregados o partículas al ser incubada *in vitro* con oligodeoxinucleótidos (ODNs). La naturaleza agregada de los antígenos, así como la capacidad inmunoestimuladoras de los ODNs, podrían contribuir con la inmunogenicidad y capacidad protectora de preparados vacunales contra el dengue obtenidos a partir de ambas regiones del virus.

El presente trabajo evalúa el efecto inmunoestimulador de una versión modificada del ODN 2216, el ODN PolyIC y del ODN resultante de la unión de los ODNs 2216 y K3, empleados en la agregación de la proteína recombinante DIIC-2 (dominio III de la envoltura del VD2 fusionado al extremo N-terminal de la cápsida del mismo serotipo viral). Luego de la selección de la variante más inmunogénica en ratones BALB/c, se evalúa la capacidad protectora en ratones y monos de los agregados de las proteínas DIIC-2 y C-2 (proteína recombinante de la cápsida del VD2) obtenidos con el ODN seleccionado.

Principales resultados y originalidad científica

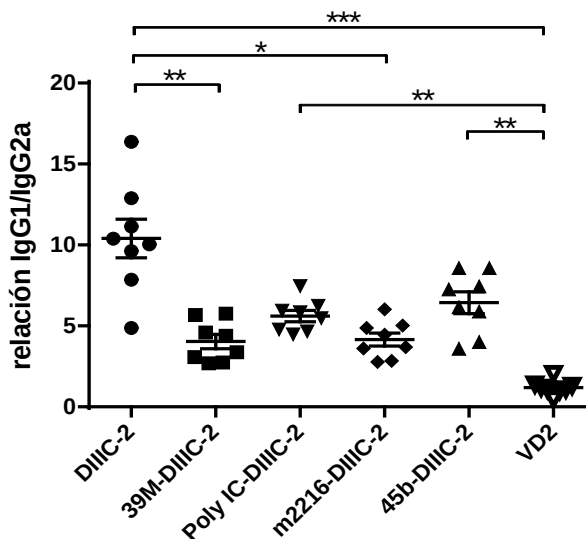
Este trabajo demuestra por primera vez la importancia de la secuencia del ODN y la naturaleza agregada del antígeno vacunal en la inmunogenicidad y capacidad protectora del mismo en ratones y primates no humanos. A partir de la proteína DIIC-2 purificada y agregada con diferentes secuencias de ODNs, manteniendo una cantidad constante de 2 µg de ODN, se realizó un esquema de inmunización en ratones BALB/c donde se evaluó la inmunogenicidad de la proteína en términos de respuesta inmune humoral y celular.

Como controles del experimento se incluyó un grupo de animales inmunizado con la proteína DIIC-2 agregada con una mezcla de ODNs de 45 bases de secuencias aleatorias (previamente estudiado) y un grupo inmunizado con la proteína soluble. Además otro grupo se inmunizó con una preparación placebo que contenía una mezcla de los ODNs empleados en la agregación de DIIC-2 y a un grupo de animales se les administró una preparación infectiva de VD2 (control positivo).

Primeramente se analizó el patrón de subclases de inmunoglobulinas IgG1 e IgG2a específicas al VD2, generado tras la inmunización. Como se observa en la figura 1, la mayor relación IgG1/IgG2a se obtuvo en el grupo de animales inmunizados con la proteína DIIC-2 soluble, mientras que los valores más bajos se observaron en el grupo control positivo. Por otra parte, en los grupos inmunizados con las formulaciones que contenían los diferentes ODNs se obtuvieron valores intermedios, siendo menores los de los grupos que recibieron los ODNs 39M y m2216. Estos dos últimos mostraron

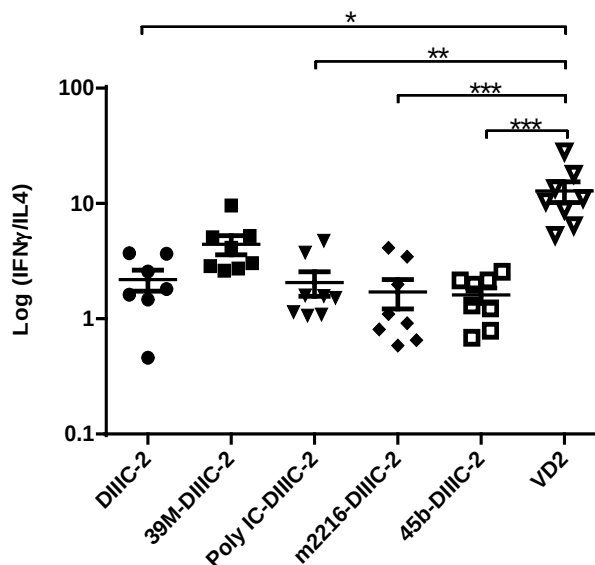
diferencias estadísticamente significativas con el grupo inmunizado con la proteína soluble ($p<0,05$), mientras que fueron similares al control positivo ($p>0,05$).

Figura 1. Gráfico que representa la relación de las inmunoglobulinas IgG1/IgG2a específicas al VD2, 15 días tras la última dosis. La significación estadística se evaluó a través de la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis y la prueba de comparación múltiple de Dunn (*: $p<0,05$; **: $p<0,01$; ***: $p<0,001$), $N=8$. Los datos representan la media $\pm$ el error estándar de la media.



Por otro lado, como medida del patrón de respuesta inmune celular inducido tras la inmunización, se determinó la relación IFN γ /IL4 (Figura 2). Los valores obtenidos para todas las preparaciones ensayadas fueron estadísticamente similares, sin embargo, solo la relación obtenida en el grupo que recibió el ODN 39M, fue estadísticamente similar a la del grupo control positivo ($p>0,05$).

Figura 2. Gráfico que representa el logaritmo de la relación de las citocinas IFN γ /IL4 secretadas por los esplenocitos estimulados con VD2, 30 días tras la última dosis. La significación estadística se evaluó a través de la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y la prueba de comparación múltiple de Dunn (*: $p<0,05$; **: $p<0,01$; ***: $p<0,001$), $N=8$. Los datos representan la media $\pm$ el error estándar de la media.



Teniendo en cuenta los resultados anteriores se seleccionó el ODN 39M para los siguientes estudios. A continuación se realizó un segundo esquema de inmunización en ratones BALB/c con el objetivo de determinar la capacidad protectora de las formulaciones 39M-DIIC-2 en el modelo de encefalitis viral en ratones. Como resultado

se observó que luego de la inoculación intracraneal con una cepa de VD2 neuroadaptada, la carga viral en el cerebro de los animales de ambos grupos fue significativamente inferior a la detectada en el grupo placebo ($p<0,05$) (Figura 3A). Adicionalmente, la capacidad protectora de la preparación 39M-DIIC-2 se evaluó en un modelo de ratones inmunocomprometidos $CD11c^{+}-Cre^{+/-}ifnar1^{fl/fl}$, donde se desarrolla una infección sistémica tras la inoculación de cepas virales no adaptadas a ratón. En los animales inmunizados con la formulación 39M-DIIC-2 se observó una reducción significativa ($p<0,01$) de la carga viral ($<10^{2,3}$ ufp/mL) con respecto al grupo Placebo ($10^{4,2}$ ufp/mL).

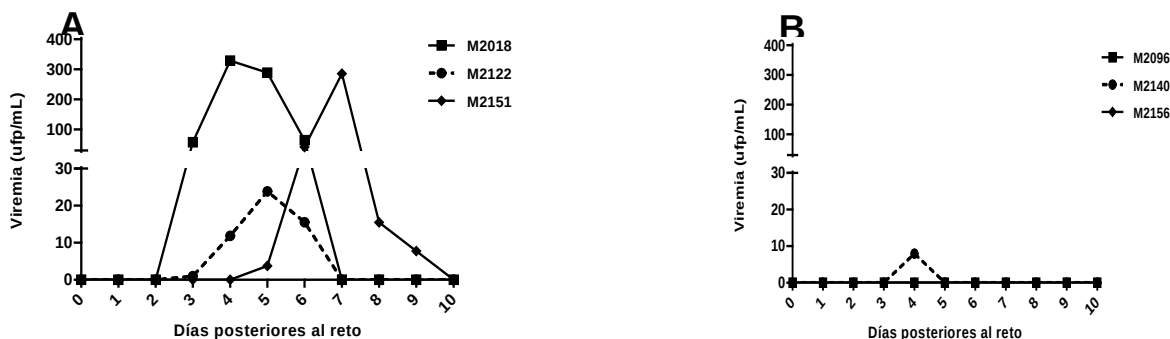


Figura 3. Gráfico que representa los niveles de protección tras el reto viral con VD2 en ratones. A: Carga viral en el cerebro de ratones BALB/c siete días después del reto viral. La línea discontinua indica el límite de detección de la técnica de aislamiento viral. Los datos representan la media $\pm$ el error estándar de la media. La significación estadística se evaluó a través de la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y la prueba de comparación múltiple de Dunn (*: $p<0,05$; **: $p<0,01$), $N=8$. B: Carga viral en el suero de ratones $CD11c-Cre^{+/-}ifnar1^{fl/fl}$ tres días después del reto viral. La línea discontinua indica el límite de detección de la técnica de aislamiento viral. Los datos representan la media $\pm$ el error estándar de la media. La significación estadística se evaluó a través de la prueba no paramétrica de Mann-Whitney (**: $p<0,01$), $N=7$.

Una vez demostrada la capacidad protectora de las preparaciones 39M-DIIC-2 y 39M-C-2, se realizó un estudio en primates no humanos (tres grupos). Un grupo se inmunizó con la formulación 39M-DIIC-2, el otro con la formulación C-2-39M y el otro recibió una preparación placebo. Se administraron cuatro dosis cada dos meses, se retaron con 10^3 ufp de VD2 un mes después de la última dosis y se cuantificó la viremia a partir del suero extraído empleando células Vero. Los animales del grupo control desarrollaron una viremia con una duración media de cuatro días y títulos virales máximos de $10^{2,5}$ ufp/mL, $10^{1,4}$ ufp/mL y $10^{2,4}$ ufp/mL (Figura 9A). Por el contrario, los animales del grupo inmunizado con la formulación 39M-DIIC-2 se protegieron totalmente (Figura 9B). El análisis estadístico de la media de la viremia empleando la prueba no paramétrica Mann-Whitney mostró diferencias estadísticas entre los dos grupos ($p=0,0077$). Para el caso de los animales inmunizados con la formulación 39M-C-2 se desarrolló una viremia con una duración de 2,3 días. Los animales M2072 y M2126 tuvieron títulos virales de $10^{1,9}$ ufp/mL y $10^{1,6}$ ufp/mL, respectivamente; mientras que el animal M2048 estuvo completamente protegido. A pesar de detectarse una viremia en este grupo de animales los resultados muestran una reducción significativa de la misma con respecto

al grupo placebo en los días cuatro, cinco y seis posteriores al reto viral ($p=0.049$, $p=0.033$, $p=0.016$, respectivamente) (Figura 9C).

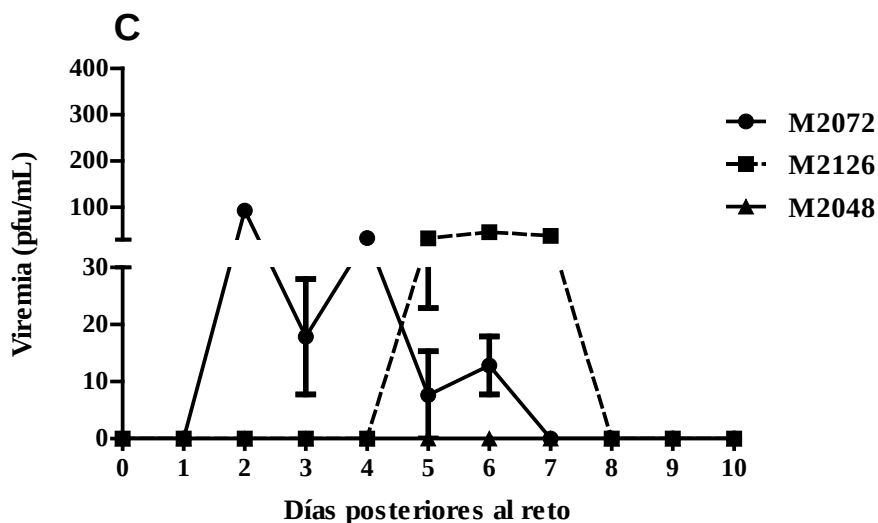


Figura 9. Gráfico que representa los niveles de viremia tras el reto viral. A, monos inmunizados con la formulación placebo. B, monos inmunizados con la formulación 39M-DIIIC-2. C, monos inmunizados con la formulación 39M-C-2. La viremia se determinó por aislamiento directo en células Vero.

Impacto social y económico

La Fiebre del Dengue y la Fiebre Hemorrágica del Dengue adquieren cada vez mayor importancia como problemas de salud, con alrededor de 350 millones de casos de Fiebre del Dengue, de ellos 96 millones desarrollan algún grado de enfermedad severa. En Cuba han ocurrido varias epidemias bien definidas, entre las cuales se destacan la del 1981 y 1997. Teniendo en cuenta que no existe protección cruzada entre los cuatro serotipos virales nuestra población esta susceptible a dicha enfermedad. A pesar de los numerosos esfuerzos que se realizan para eliminar el agente transmisor, contar con una vacuna efectiva sería una solución total de gran impacto social y económico. Actualmente no existe una vacuna disponible en el mercado y el candidato más avanzado en el mundo se corresponde con cepas virales quiméricas atenuadas con resultados preliminares de eficacias menores de un 60%.

Los resultados de este trabajo demuestran la capacidad protectora en ratones y primates no humanos de candidatos vacunales recombinantes basados la proteína de la cápsida viral y agregados con un oligodeoxinucleótido específico que potencia la respuesta inmune generada. Estos resultados abren el camino futuro a estudios clínicos con estos candidatos vacunales. Contar con un candidato vacunal contra este patógeno humano reviste gran importancia teniendo en cuenta la expansión global que ha alcanzado la enfermedad y los costos que implican el control del vector trasmisor el virus, que resulta ser la única forma actual de controlar las epidemias.

Bibliografía

1. Gromowski, G. D. and Barrett, A. D., Characterization of an antigenic site that contains a dominant, type-specific neutralization determinant on the envelope protein domain III (ED3) of dengue 2 virus. *Virology* 2007. 366: 349-360.
2. Gagnon, S. J., Zeng, W., Kurane, I., Ennis, F. A., Identification of two epitopes on the dengue 4 virus capsid protein recognized by a serotype-specific and a panel of serotype-cross-reactive human CD4+ cytotoxic T-lymphocyte clones. *J.Virol.* 1996. 70: 141-147.
3. Kuhn, R. J., Zhang, W., Rossmann, M. G., Pletnev, S. V., Corver, J., Lenches, E., Jones, C. T. et al, Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* 2002. 108: 717-725.
4. Mukhopadhyay, S., Kuhn, R. J., Rossmann, M. G., A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat.Rev.Microbiol.* 2005. 3: 13-22.
5. Krug, A., Rothenfusser, S., Hornung, V., Jahrsdorfer, B., Blackwell, S., Ballas, Z. K., Endres, S. et al, Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur.J.Immunol.* 2001. 31: 2154-2163.
6. Vollmer, J., Weeratna, R., Payette, P., Jurk, M., Schetter, C., Laucht, M., Wader, T. et al, Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities. *Eur.J.Immunol.* 2004. 34: 251-262.
7. Guzylack-Piriou, L., Balmelli, C., McCullough, K. C., Summerfield, A., Type-A CpG oligonucleotides activate exclusively porcine natural interferon-producing cells to secrete interferon-alpha, tumour necrosis factor-alpha and interleukin-12. *Immunology* 2004. 112: 28-37.
8. Mena, A., Nichani, A. K., Popowych, Y., Ioannou, X. P., Godson, D. L., Mutwiri, G. K., Hecker, R. et al, Bovine and ovine blood mononuclear leukocytes differ markedly in innate immune responses induced by Class A and Class B CpG-oligodeoxynucleotide. *Oligonucleotides.* 2003. 13: 245-259.
9. Mena, A., ichani, A. K., opowych, Y., odson, D. L., ent, D., ownsend, H. G., utwiri, G. K. et al, Innate immune responses induced by CpG oligodeoxyribonucleotide stimulation of ovine blood mononuclear cells. *Immunology* 2003. 110: 250-257.
10. Verthelyi, D. and Klinman, D. M., Immunoregulatory activity of CpG oligonucleotides in humans and nonhuman primates. *Clin.Immunol.* 2003. 109: 64-71.
11. Schellack, C., Prinz, K., Egyed, A., Fritz, J. H., Wittmann, B., Ginzler, M., Swatosch, G. et al, IC31, a novel adjuvant signaling via TLR9, induces potent cellular and humoral immune responses. *Vaccine* 2006. 24: 5461-5472.
12. Halstead, S., *Dengue*. Imperial College Press, London 2008.
13. Rey, F. A., Heinz, F. X., Mandl, C., Kunz, C., Harrison, S. C., The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* 1995. 375: 291-298.
14. Gil, L., Lopez, C., Lazo, L., Valdes, I., Marcos, E., Alonso, R., Gambe, A. et al, Recombinant nucleocapsid-like particles from dengue-2 virus induce protective CD4+ and CD8+ cells against viral encephalitis in mice. *Int.Immunol.* 2009. 21: 1175-1183.
15. Gil, L., Izquierdo, A., Lazo, L., Valdes, I., Ambala, P., Ochola, L., Marcos, E. et al, Capsid protein: evidences about the partial protective role of neutralizing antibody-independent immunity against dengue in monkeys. *Virology* 2014. 456-457: 70-76.

16. Lopez, C., Gil, L., Lazo, L., Menendez, I., Marcos, E., Sanchez, J., Valdes, I. et al, In vitro assembly of nucleocapsid-like particles from purified recombinant capsid protein of dengue-2 virus. *Arch.Virol.* 2009. 154: 695-698.
17. Lazo, L., Gil, L., Lopez, C., Valdes, I., Marcos, E., Alvarez, M., Blanco, A. et al, Nucleocapsid-like particles of dengue-2 virus enhance the immune response against a recombinant protein of dengue-4 virus. *Arch.Virol.* 2010. 155: 1587-1595.
18. Valdes, I., Bernardo, L., Gil, L., Pavon, A., Lazo, L., Lopez, C., Romero, Y. et al, A novel fusion protein domain III-capsid from dengue-2, in a highly aggregated form, induces a functional immune response and protection in mice. *Virology* 2009. 394: 249-258.
19. Vollmer, J., CpG motifs to modulate innate and adaptative immune response. *Int.Rev.Immunol.* 2006. 25: 125.
20. Riedl, P., Stober, D., Oehninger, C., Melber, K., Reimann, J., Schirmbeck, R., Priming Th1 immunity to viral core particles is facilitated by trace amounts of RNA bound to its arginine-rich domain. *J.Immunol.* 2002. 168: 4951-4959.
21. Donnelly, J., Berry, K., Ulmer, J. B., Technical and regulatory hurdles for DNA vaccines. *Int.J.Parasitol.* 2003. 33: 457-467.
22. Takeshita, F., Leifer, C. A., Gursel, I., Ishii, K. J., Takeshita, S., Gursel, M., Klinman, D. M., Cutting edge: Role of Toll-like receptor 9 in CpG DNA-induced activation of human cells. *J.Immunol.* 2001. 167: 3555-3558.
23. Verthelyi, D., Ishii, K. J., Gursel, M., Takeshita, F., Klinman, D. M., Human peripheral blood cells differentially recognize and respond to two distinct CPG motifs. *J.Immunol.* 2001. 166: 2372-2377.
24. Chaung, H. C., CpG oligodeoxynucleotides as DNA adjuvants in vertebrates and their applications in immunotherapy. *Int.Immunopharmacol.* 2006. 6: 1586-1596.
25. Yauch, L. E. and Shresta, S., Mouse models of dengue virus infection and disease. *Antiviral Res.* 2008. 80: 87-93.
26. Pancharoen, C. and Thisyakorn, U., Neurological manifestations in dengue patients. *Southeast Asian J.Trop.Med.Public Health* 2001. 32: 341-345.
27. Witayathawornwong, P., Fatal dengue encephalitis. *Southeast Asian J.Trop.Med.Public Health* 2005. 36: 200-202.
28. Martin, J., Hermida, L., Castro, J., Lazo, L., Martinez, R., Gil, L., Romero, Y. et al, Viremia and antibody response in green monkeys (*Chlorocebus aethiops sabaeus*) infected with dengue virus type 2: a potential model for vaccine testing. *Microbiol.Immunol.* 2009. 53: 216-223.
29. Coe, C. L., Savage, A., Bromley, L. J., Phylogenetic influences on hormone levels across the primate order. *Am.J.Primatol.* 1992. 28: 81-100.
30. Higley, J. D., Kings, S. T. J., Hasert, M. F., Champoux, M., Soumi, S. J., Linnoila, M., Stability of interindividual differences in serotonin function and its relationship to severe aggression and competent social behavior in rhesus macaque females. *Neuropsychopharmacology* 1996. 14: 67-76.
31. Page, S. L. and Goodman, M., Catarrhine phylogeny: noncoding DNA evidence for a diphyletic origin of the mangabeys and for a human-chimpanzee clade. *Mol.Phylogenet.Evol* 2001. 18: 14-25.

32. Raaum, R. L., Stermer, K. N., Noviello, C. M., Stewart, C. B., Disotell, T. R., Catarrhine primate divergence dates estimated from complete mitochondrial genomes: concordance with fossil and nuclear DNA evidence. *J.Hum.Evol.* 2005. 48: 237-257.
33. Halstead, S. B. and Palumbo, N. E., Studies on the immunization of monkeys against dengue. II. Protection following inoculation of combinations of viruses. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 1973. 22: 375-381.
34. Valdes, I., Hermida, L., Martin, J., Menendez, T., Gil, L., Lazo, L., Castro, J. et al, Immunological evaluation in nonhuman 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.
35. Wahala, W. M., Kraus, A. A., Haymore, L. B., ccavitti-Loper, M. A., de Silva, A. M., Dengue virus neutralization by human immune sera: Role of envelope protein domain III-reactive antibody. *Virology* 2009. 392: 103-113.
36. Midgley, C. M., Bajwa-Joseph, M., Vasanawathana, S., Limpitikul, W., Wills, B., Flanagan, A., Waiyaiya, E. et al, An in-depth analysis of original antigenic sin in dengue virus infection. *J.Virol.* 2011. 85: 410-421.
37. Wahala, W. M., Huang, C., Butrapet, S., White, L. J., de Silva, A. M., Recombinant dengue type 2 viruses with altered e protein domain III epitopes are efficiently neutralized by human immune sera. *J.Virol.* 2012. 86: 4019-4023.
38. Williams, K. L., Wahala, W. M., Orozco, S., de Silva, A. M., Harris, E., Antibodies targeting dengue virus envelope domain III are not required for serotype-specific protection or prevention of enhancement in vivo. *Virology* 2012. 249: 12-20.
39. White, L. J., Sariol, C. A., Mattocks, M. D., Wahala, W. M., Yingsiwaphat, V., Collier, M. L., Whitley, J. et al, An alphavirus vector-based tetravalent dengue vaccine induces a rapid and protective immune response in Macaques that differs qualitatively from immunity induced by live virus infection. *J.Virol.* 2013. 87: 3409-3424.
40. Valdes, I., Gil, L., Romero, Y., Castro, J., Puente, P., Lazo, L., Marcos, E. et al, 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: 455-459.
41. Valdes, I., Hermida, L., Gil, L., Lazo, L., Castro, J., Martin, J., Bernardo, L. et al, Heterologous prime-boost strategy in non-human primates combining the infective dengue virus and a recombinant protein in a formulation suitable for human use. *Int.J.Infect.Dis.* 2010. 14: e377-e383.
42. Gil, L., Bernardo, L., Pavon, A., Izquierdo, A., Valdes, I., Lazo, L., Marcos, E. et al, Recombinant nucleocapsid-like particles from dengue-2 induce a functional serotype-specific cell-mediated immunity in mice. *J.Gen.Virol.* 2012. 93: 1204-1214.
43. Izquierdo, A., Valdes, I., Gil, L., Hermida, L., Gutierrez, S., Garcia, A., Bernardo, L. et al, Serotype specificity of recombinant fusion protein containing domain III and capsid protein of dengue virus 2. *Antiviral Res.* 2012. 95: 1-8.
44. Shresta, S., Kyle, J. L., Snider, H. M., Basavapatna, M., Beatty, P. R., Harris, E., Interferon-dependent immunity is essential for resistance to primary dengue virus infection in mice, whereas T- and B-cell-dependent immunity are less critical. *J.Virol.* 2004. 78: 2701-2710.

45. Dejnirattisai, W., Duangchinda, T., Lin, C. L., Vasanawathana, S., Jones, M., Jacobs, M., Malasit, P. et al, A complex interplay among virus, dendritic cells, T cells, and cytokines in dengue virus infections. *J.Immunol.* 2008. 181: 5865-5874.
46. Gunther, V. J., Putnak, R., Eckels, K. H., Mammen, M. P., Scherer, J. M., Lyons, A., Sztein, M. B., Sun, W., A human challenge model for dengue infection reveals a possible protective role for sustained interferon gamma levels during the acute phase of illness. *Vaccine* 2011. 29: 3895-3904.
47. Hatch, S., Endy, T. P., Thomas, S., Mathew, A., Potts, J., Pazoles, P., Libraty, D. H. et al, Intracellular Cytokine Production by Dengue Virus-specific T cells Correlates with Subclinical Secondary Infection. *J.Infect.Dis.* 2011. 203: 1282-1291.
48. Hermida, L., Bernardo, L., Martin, J., Alvarez, M., Prado, I., Lopez, C., Sierra, B. L. et al, A recombinant fusion protein containing the domain III of the dengue-2 envelope protein is immunogenic and protective in nonhuman primates. *Vaccine* 2006. 24: 3165-3171.
49. Bernardo, L., Izquierdo, A., Alvarez, M., Rosario, D., Prado, I., Lopez, C., Martinez, R. et al, Immunogenicity and protective efficacy of a recombinant fusion protein containing the domain III of the dengue 1 envelope protein in non-human primates. *Antiviral Res.* 2008. 80: 194-199.
50. Clements, D. E., Collier, B. A., Lieberman, M. M., Ogata, S., Wang, G., Harada, K. E., Putnak, J. R. et al, Development of a recombinant tetravalent dengue virus vaccine: Immunogenicity and efficacy studies in mice and monkeys. *Vaccine* 2010. 28: 2705-2715.
51. Robert, P. J., Collier, B. A., Voss, G., Vaughn, D. W., Clements, D., Peters, I., Bignami, G. et al, An evaluation of dengue type-2 inactivated, recombinant subunit, and live-attenuated vaccine candidates in the rhesus macaque model. *Vaccine* 2005. 23: 4442-4452.
52. Halstead, S. B., Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypotheses and discussion. *Yale J.Biol.Med.* 1970. 42: 350-362.
53. Chen, Z., Liu, L. M., Gao, N., Xu, X. F., Zhang, J. L., Wang, J. L., An, J., Passive protection assay of monoclonal antibodies against dengue virus in suckling mice. *Curr.Microbiol.* 2009. 58: 326-331.
54. Sabchareon, A., Wallace, D., Sirivichayakul, C., Limkittikul, K., Chanthavanich, P., Suvannadabba, S., Jiwariyavej, V. et al, Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial. *Lancet* 2012. 380: 1559-1567.
55. Capeding, M. R., Tran, N. H., Hadinegoro, S. R., Ismail, H. I., Chotpitayasunondh, T., Chua, M. N., Luong, C. Q. et al, Clinical efficacy and safety of a novel tetravalent dengue vaccine in healthy children in Asia: a phase 3, randomised, observer-masked, placebo-controlled trial. *Lancet* 2014.
56. Moi, M. L., Takasaki, T., Kurane, I., Efficacy of tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren. *Lancet* 2013. 30: 1094.
57. Lobigs, M., Mullbacher, A., Lee, E., Evidence that a mechanism for efficient flavivirus budding upregulates MHC class I. *Immunol.Cell Biol.* 2004. 82: 184-188.
58. Vaughn, D. W. and Wellington S., Proceedings of the "Dengue virus: molecular basis of the cell entry pathogenesis". *Viena, Austria* 2003.

59. Simmons, M., Porter, K. R., Hayes, C. G., Vaughn, D. W., 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: 9577-9585.
60. van der Most, R. G., Murali-Krishna, K., Ahmed, R., Strauss, J. H., Chimeric yellow fever/dengue virus as a candidate dengue vaccine: quantitation of the dengue virus-specific CD8 T-cell response. *J.Virol.* 2000. 74: 8094-8101.
61. Yauch, L. E., Zellweger, R. M., Kotturi, M. F., Qutubuddin, A., Sidney, J., Peters, B., Prestwood, T. R. et al, A protective role for dengue virus-specific CD8+ T cells. *J.Immunol.* 2009. 182: 4865-4873.
62. Gil, L., Lopez, C., Blanco, A., Lazo, L., Martin, J., Valdes, I., Romero, Y. et al, The cellular immune response plays an important role in protecting against dengue virus in the mouse encephalitis model. *Viral Immunol.* 2009. 22: 23-30.
63. Hawke, S., Stevenson, P.G., Freeman, S., Bangham, C. R., Long-term persistence of activated cytotoxic T lymphocytes after viral infection of the central nervous system. *J.Exp.Med.* 1998. 187: 1575-1583.
64. Williams, M. A., Holmes, B. J., Sun, J. C., Bevan, M. J., Developing and maintaining protective CD8+ memory T cells. *Immunol.Rev.* 2006. 211:146-53.: 146-153.
65. Marten, N. W., Stohlman, S. A., Bergmann, C. C., Role of viral persistence in retaining CD8+ T cells within central nervous system. *J.Virol.* 2000. 74: 7903-7912.
66. Welsh, R. M., Selin, L. K., Szomolanyi-Tsuda, E., Immunological memory to viral infections. *Annu.Rev.Immunol.* 2004. 22: 1-33.
67. Hanari, A., Dutoit, V., Cellerai, C., Bart, A., Du Pasquier, R. A., Pantaleo, G., Functional signatures of protective antiviral T-cell immunity in human virus infections. *Immunol.Rev.* 2006. 211: 236-254.
68. Gagnon, S. J., Ennis, F. A., Rothman, A. L., Bystander target cell lysis and cytokine production by dengue virus-specific human CD4(+) cytotoxic T-lymphocyte clones. *J.Virol.* 1999. 73: 3623-3629.
69. van der Most, R. G., Murali-Krishna, K., Ahmed, R., Prolonged presence of effector-memory CD8 T cells in the central nervous system after dengue virus encephalitis. *Int.Immunol.* 2003. 15: 119-125.
70. Mongkolsapaya, J., Duangchinda, T., Dejnirattisai, W., Vasanawathana, S., Avirutnan, P., Jairungsri, A., Khemnu, N. et al, T cell responses in dengue hemorrhagic fever: are cross-reactive T cells suboptimal? *J.Immunol.* 2006. 176: 3821-3829.
71. Mangada, M. M., Ennis, F. A., Rothman, A. L., Quantitation of dengue virus specific CD4+ T cells by intracellular cytokine staining. *J.Immunol.Methods* 2004. 284: 89-97.
72. Mangada, M. M. and Rothman, A. L., Altered cytokine responses of dengue-specific CD4+ T cells to heterologous serotypes. *J.Immunol.* 2005. 175: 2676-2683.
73. Kurane, I., Innis, B. L., Nisalak, A., Hoke, C., Nimmannitya, S., Meager, A., Ennis, F. A., Human T cell responses to dengue virus antigens. Proliferative responses and interferon gamma production. *J.Clin.Invest* 1989. 83: 506-513.
74. Dharakul, T., Kurane, I., Bhamarapravati, N., Yoksan, S., Vaughn, D. W., Hoke, C. H., Ennis, F. A., Dengue virus-specific memory T cell responses in human volunteers receiving a live attenuated dengue virus type 2 candidate vaccine. *J.Infect.Dis.* 1994. 170: 27-33.