

Nueva formulación vacunal tetravalente contra el dengue basada en la combinación de cuatro proteínas quiméricas dominio III-cápsida induce una respuesta inmune funcional en ratones y primates no humanos

Autores Principales: Edith Suzarte¹, Lázaro Gil¹, Lisset Hermida¹, Ernesto Marcos¹, Iris Valdés¹, Laura Lazo¹, Gerardo Guillén¹, Mayling Álvarez², Alienys Izquierdo², María G. Guzmán².

Otros Autores: Yusleidi Pérez¹, Angélica García², José A. Silva¹, Jorge Castro¹, Enma Brown¹, Alexander Hernández¹, Yadira Rodríguez¹, Lázaro López¹, Yassel Ramos¹, Viviana Falcón¹, Rosa Ramírez², Yaremis Romero¹, Aracelys Blanco¹, Oney Ortega², Aina Mendez², Karem Cobas¹, Sonia González¹, Mariela Vazquez¹.

Colaboradores: 18

Filiaciones:

¹ Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

² Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”

Autor para la correspondencia:

Edith Suzarte Portal

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

E-mail: edith.suzarte@cigb.edu.cu FAX: (53-7) 271-4764

1 Resumen

Antecedentes: El candidato vacunal recombinante cubano contra el dengue está basado en dos regiones virales relevantes: el dominio III de la proteína de la envoltura y la proteína de la cápsida.

Se conoce que el primero media la unión del virus con el receptor celular y además contiene epitopos de anticuerpos neutralizantes. Por su parte, la proteína de la cápsida induce inmunidad protectora mediada por células en ratones y monos; y se ha demostrado que en presencia de oligonucleótidos forma partículas con capacidad inmunopotenciadora. Previamente se había obtenido la proteína recombinante dominioIII-cápsida (DIIC) del serotipo 2, la cual administrada en forma agregada fue capaz de inducir una respuesta inmune protectora en ratones y monos, constituyendo este resultado objeto de un premio anterior de la academia.

Problema a resolver: Teniendo en cuenta la ausencia de inmunidad cruzada protectora de larga duración entre los serotipos virales, unido al hecho de que una inmunidad heterotípica predispone a las formas más severas de la enfermedad, se hace necesario el desarrollo de un candidato vacunal tetravalente que induzca una inmunidad funcional contra los cuatro serotipos virales a la vez. Este representa la única alternativa posible en el desarrollo de una vacuna contra el dengue, enfermedad de alta incidencia a nivel mundial que carece de solución vacunal o terapéutica hasta el momento.

Resultados: Se describe la obtención por primera vez de las variantes quiméricas DIIC-1, 3 y 4 por vía recombinante con el fin de combinarlas con DIIC-2 en un candidato vacunal tetravalente contra el dengue. Por primera vez, se evaluó en ratones BALB/c la inmunogenicidad de las proteínas recombinantes DIIC-1, 3 y 4 agregadas en formulaciones independientes o combinadas con DIIC-2 en una formulación tetravalente, demostrándose la inducción de respuesta humoral, celular y protectora contra los cuatro serotipo virales. Adicionalmente se definió que la respuesta celular generada por la formulación tetravalente DIIC en términos de secreción de IFN- γ en ratones está dirigida fundamentalmente hacia el extremo C-terminal de la proteína de la cápsida de los cuatro serotipos. Finalmente se demostró la capacidad de la formulación tetravalente DIIC de inducir una respuesta inmune humoral y celular funcional en primates no humanos, utilizando diferentes vías de administración. Los resultados obtenidos en este trabajo están avalados por tres publicaciones internacionales: Archives of Virology. 2014. 58(4): 219-226 FI (2.4); International Immunology, 2015. Vol. 27, No. 8, pp. 367-379 FI (3.2); Vaccine. 2015.

33:1474–1482 FI (3.6) y una patente.

Conclusiones: La formulación tetravalente DIIC induce una respuesta funcional contra los cuatro serotipos virales en ratones y monos lo que abre las puertas de los estudios clínicos a esta nueva formulación como candidato vacunal contra el dengue.

2 Comunicación Corta

2.1 Introducción

Actualmente no existe una vacuna disponible contra el dengue, enfermedad transmitida por mosquitos que afecta a 390 millones de personas cada año en el mundo. Nuestro país ha sido afectado por varias epidemias desde 1977 y a pesar de los numerosos esfuerzos que se realizan para eliminar el agente transmisor, el dengue continúa siendo un problema de salud importante.

Teniendo en cuenta la ausencia de inmunidad cruzada protectora de larga duración entre los serotipos virales, unido al hecho de que una inmunidad heterotípica predispone a las formas más severas de la enfermedad, se hace necesario el desarrollo de un candidato vacunal tetravalente que induzca una inmunidad funcional contra los cuatro serotipos virales a la vez, de lo contrario se contribuiría a susceptibilizar al individuo frente a una infección heteróloga subsecuente. El presente trabajo describe la obtención por primera vez de un candidato tetravalente formado por cuatro proteínas basadas en la fusión del dominio III de la proteína de la envoltura y la proteína de la cápsida de cada serotipo viral (DIIC), en una formulación agregada con oligonucleótidos (ODN). La racionalidad del diseño se basa en el dominio III media la unión del virus con el receptor celular y contiene epitopos de anticuerpos neutralizantes. Mientras que la proteína de la cápsida induce inmunidad protectora mediada por células en ratones y monos y se ha demostrado que en presencia de ODNs, forma partículas con capacidad inmunopotenciadora. La evidencia previa de que la proteína recombinante DIIC del serotipo 2, administrada en forma agregada fue capaz de inducir una respuesta inmune funcional y protectora en ratones y monos, soporta esta idea y avala el desarrollo de las restantes variantes quiméricas DIIC.

Este trabajo describe la obtención por vía recombinante, purificación y caracterización antigénica de las variantes quiméricas DIIC-1, 3 y 4 del virus del dengue. Estudia además la inmunogenicidad y eficacia protectora en ra-

tones de la formulación formada por la combinación de estas proteínas con la previamente obtenida DIIC-2, agregadas con el ODN39M, en un candidato tetravalente (tetra DIIC); así como las regiones de las proteínas DIIC que más aportan a la respuesta celular. Finalmente describe la evaluación en primates no humanos de la inmunogenicidad de la formulación tetra DIIC.

2.2 Principales resultados y originalidad científica

Este trabajo describe por primera vez la obtención por vía recombinante de una molécula quimérica basada en la combinación de la cápsida y el dominio III de los serotipos 1, 3 y 4. Los genes que codifican para ambas proteínas fusionados se clonaron en el plasmidio pET28a, vector de expresión de *E. coli* bajo las señales del promotor T7.

Se obtuvieron adecuados niveles de expresión de las proteínas de interés en la cepa BL21(DE3) utilizando IPTG como inductor. Las bandas mayoritarias, correspondientes a cada proteína quimérica, se inmunoidentificaron con líquido ascítico hiperinmune contra dengue proveniente de ratón (LAH). Las proteínas DIIC se purificaron y se caracterización antigénicamente a través de la medición de la reactividad frente a anticuerpos murinos y humanos positivos a dengue. Como muestra la figura 1 se observó un alto reconocimiento de las variantes DIIC1, 3 y 4 por los sueros ensayados, lo que sugiere un plegamiento adecuado de la región del dominio III en el contexto de la proteína de la cápsida homóloga.

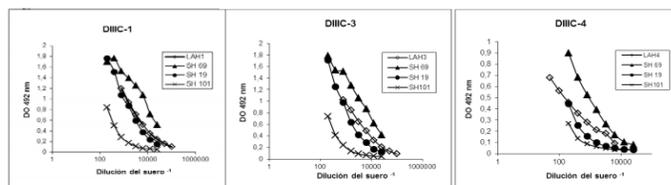


Figura 1: Reactividad de las proteínas recombinantes DIIC frente a sueros anti-dengue murinos y humano medida por ELISA. Suero de ratón (rojo): líquido ascítico hiperinmune (LAH1-4) contra cada serotipo del dengue. Suero humano (azul): SH 69, SH 19, SH 101 (sueros colectados en la Habana en la epidemia del 2000 con altos títulos antidengue). Los resultados representan la media y el error estándar de la media de tres experimentos por independiente.

La caracterización por microscopía electrónica de las proteínas quiméricas DIIC incubadas con el ODN 39M, oligonucleótido de probada capacidad inmunoestimuladora, reveló la presencia de partículas entre 50 y 55 nm dependientes de la adición del ODN. La naturaleza particulada de estos agregados podría favorecer su internalización por las células dendríticas y la transportación a los linfonodos, con la subsecuente inducción de una respuesta inmune óptima.

Las proteínas quiméricas DIIC se evaluaron por independientes o formando una formulación tetravalente con DIIC-2 en ratones BALB/c. Las proteínas utilizadas como inmunógenos se incubaron con el ODN 39M para promover la formación de agregados. Se utilizó la proporción proteína: ODN que permitía el 50 % de la precipitación proteica y por consiguiente la existencia en la formulación de especies agregadas solubles e insolubles. Quince días después de la tercera inmunización se determinó la respuesta humoral anti-proteína recombinante en los sueros de los ratones inmunizados. Todos los animales se-roconvirtieron contra cada proteína y la formulación tetravalente indujo altos títulos antiDIIC específico contra los 4 serotipos virales. Los resultados evidenciaron una ausencia de competencia antigénica en la mezcla proteica tetravalente reflejando por una inmunogenicidad equivalente en la respuesta humoral obtenida por la formulación monovalente en comparación con la tetravalente. Al evaluar la actividad neutralizante (Tabla1) como reflejo de la funcionalidad de la respuesta humoral se observó la aparición de una respuesta contra el serotipo 1, 2 y 3 tanto en la formulación tetravalente como monovalente siendo la respuesta contra el serotipo 1 la de menor magnitud. En el caso particular del serotipo 4 no se detectaron anticuerpos neutralizantes ni en los ratones inmunizados con la formulación tetravalente ni con la monovalente.

Grupos	Título de anticuerpos neutralizantes TPG(rango)			
	VD1	VD2	VD3	VD4
DIIC monovalente	173 (50-848)	4530 (1238-5000)	3600 (495-5000)	10
Tetra DIIC	37 (50-439)	1192 (947-4136)	3825 (873-5000)	10
Control viral	47 (50-85)	2541 (404-5000)	1129 (204-3142)	1172 (80-1992)

Tabla 1: Respuesta de anticuerpos neutralizantes generados en ratones inmunizados con formulaciones monovalentes y tetravalentes de DIIC. Los títulos se midieron por el ensayo de reducción del número de placas en células LL-CMK2. El título neutralizante se define como la dilución máxima en que se alcanza el 50% de reducción del número de placas. Se consideran respondedores títulos superiores a 1:10

Un mes tras la última dosis se midió la respuesta celular mediante la secreción de IFN- γ luego de estimulación de los esplenocitos de los ratones inmunizados con proteína recombinante DIIC (Fig. 2).

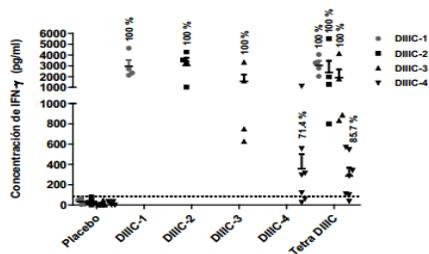


Figura 2: Niveles de secreción de IFN- γ , secretado por los esplenocitos de ratones inmunizados con formulaciones monovalentes y tetravalentes de DIIC, estimulados in vitro, 30 días tras la última dosis con las proteínas recombinantes DIIC, determinado por ELISA. Los números sobre los puntos se refieren al porcentaje de respondedores. El resultado es representativo de dos experimentos independientes.

A pesar de la menor inmunogenicidad detectada contra VD4 la formulación tetra DIIC indujo una respuesta protectora contra los cuatro serotipos virales en el modelo de encefalitis viral murino, medida por la reducción significativa de la carga viral en cerebro (Fig. 3).

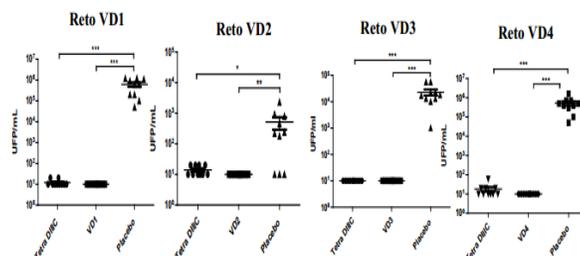


Figura 3: Ensayo de protección en el modelo de encefalitis viral. Un mes tras la última dosis los ratones se retaron intracranealmente con 50LD₅₀ de VD neuroadaptado. La carga viral en cerebro se determinó por cuantificación directa del homogenado de cerebro colectado a los siete días del reto en células Vero. Los datos representan la media \pm el error estándar de la media (N=10). El análisis estadístico se realizó utilizando el método de comparación múltiple de Dunn (*: $p < 0.05$; ***: $p < 0.001$). Los resultados son representativos de dos experimentos independientes.

La formulación tetra DIIIC se evaluó en primates no humanos utilizando por diferentes vías de administración: vía subcutánea (SC), intradérmica (ID) o intramuscular (IM). Todos los animales recibieron tres inmunizaciones espaciadas dos meses, adyuvadas en alúmina. Todos los animales inmunizados desarrollaron anticuerpos antivirales contra los cuatro serotipos. Se detectó además actividad neutralizante contra todos los serotipos del dengue (Tabla 2).

	VD1	VD2	VD3	VD4
Via SC (TPG)	43,2	290,6	198,0	55,8
Via ID (TPG)	23,4	175,1	83,2	389,0
Via IM (TPG)	29,1	392,0	58,4	83,2

Tabla 2: Respuesta humoral neutralizante inducida por la formulación tetra DIIIC administrada por diferentes vías en primates no humanos, 30 días tras la última dosis. Los títulos se midieron por PRNT en células Vero contra las cepas de VD (VD1 Jamaica, VD2 SB8553, VD3 Nicaragua y VD4 Dominica). Los datos representan la media geométrica (TPG)

Finalmente se midió la frecuencia de células productoras de IFN- γ con capacidad citotóxica partiendo de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de los monos inmunizados por ELISPOT y liberación de LDH respectivamente luego de la estimulación in vitro con cada proteína recombinante (Fig. 4).

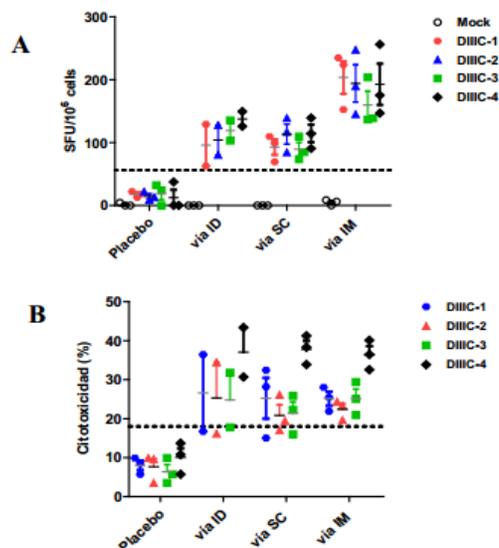


Figura 4: Respuesta celular inducida por la formulación tetravalente DIIC en monos. Los animales fueron inmunizados con la formulación tetravalente por las vías SC, IM ó ID en los días 0, 60 and 120. Los PBMC de cada animal se estimularon con las proteínas recombinantes DIIC de cada serotipo por independiente al cabo de 60 días de la última dosis. Se determinó la frecuencia de células secretoras de IFN- γ (panel A) y la actividad citotóxica medida obtiene un candidato vacunal que logra respuesta funcional involucrando ambas ramas de la respuesta inmune, contra los cuatro serotipos virales en ratones y primates no humanos. Este candidato basado en la estrategia de vacuna de subunidades resulta una alternativa económica, segura y además factible para inmunizar niños menores de un año de edad, grupo de riesgo que no podrá recibir una vacuna viva atenuada.

Los resultados aquí propuestos abren el camino futuro a estudios clínicos de este candidato vacunal.

2.3 Avales del trabajo

Los resultados presentados en este trabajo forman parte de tres publicaciones internacionales y una patente, listadas a continuación:

Publicaciones

1. Suzarte E, Marcos E, Gil L, Valdés I, Lazo L et al. Generation and characterization of potential dengue vaccine candidates based on domain III of the envelope protein and the capsid protein of the four serotypes of dengue virus. *Archives of Virology*. 2014. 58(4): 219-226.
2. Suzarte E, Gil L, Valdés I, Marcos E, Lazo L et al. A novel tetravalent formulation combining the four aggregated domain III-capsid proteins from dengue viruses induces a functional immune response in mice and monkeys. *International Immunology*, 2015. Vol. 27, No. 8, pp. 367–379.
3. Roland Zuesta, Iris Valdes, David Skibinskia, Yufang Lina, Ying Xiu Toha, Katherine Chana, Lisset Hermida et al. Tetravalent dengue DIIIc protein together with alum and ODN elicits a Th1 response and neutralizing antibodies in mice. *Vaccine*. 2015. 33:1474–1482

Patente:

Composición vacunal contra el virus dengue. Pub. No. WO/2014/101903 de 03.07.2014. International Application No: PCT/CU2013/000008 de 16.12.2013. Inventors: Hermida L., Gil L., Izquierdo A., Marcos E., Suzarte E., Guillén G. Guzman MG, Valdés I., Lazo L., García A., Alvarez M, Castro J., López L., Ramírez R., Perez Y., Pérez O., Romero Y.

3 Referencias

1. 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, Hay SI. The global distribution and burden of dengue. *Nature* 2013;496(7446):504-7.
2. Cantelar de FN, Fernandez A, Albert ML, Perez BE. Survey of dengue in Cuba. 1978-1979. *Rev Cubana Med Trop* 1981;33(1):72-8.

3. Endy TP, Nisalak A, Chunsuttitwat S, Vaughn DW, Green S, Ennis FA, Rothman AL, Libraty DH. Relationship of preexisting dengue virus (DV) neutralizing antibody levels to viremia and severity of disease in a prospective cohort study of DV infection in Thailand. *J Infect Dis* 2004;189(6): 990-1000.
4. Sangkawibha N, Rojanasuphot S, Ahandrik S, Viriyapongse S, Jatansen S, Salitul V, Phanthumachinda B, Halstead SB. Risk factors in dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. I. The 1980 outbreak. *Am J Epidemiol* 1984;120(5):653-69.
5. Burke DS, Nisalak A, Johnson DE, Scott RM. A prospective study of dengue infections in Bangkok. *Am J Trop Med Hyg* 1988;38(1):172-80.
6. Durbin AP, Whitehead SS. Dengue vaccine candidates in development. *Curr Top Microbiol Immunol* 2010;338:129-43.
7. Sabchareon A, Wallace D, Sirivichayakul C, Limkittikul K, Chanthavanich P, Suvannadabba S, Jiwariyavej V, Dulyachai W, Pengsaa K, Wartel TA, Moureau A, Saville M, Bouckennooghe A, Viviani S, Tornieporth NG, Lang J. Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial. *Lancet* 2012;380(9853):1559-67.
8. Gromowski GD, Barrett AD. 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(2): 349-60.
9. Gil L, Izquierdo A, Lazo L, Valdes I, Ambala P, Ochola L, Marcos E, Suzarte E, Kariuki T, Guzman G, Guillen G, Hermida L. Capsid protein: evidences about the partial protective role of neutralizing antibody-independent immunity against dengue in monkeys. *Virology* 2014;456-457:70-6.
10. Gil L, Lopez C, Lazo L, Valdes I, Marcos E, Alonso R, Gambe A, Martin J, Romero Y, Guzman MG, Guillen G, Hermida L. Recombinant nucleocapsid-like particles from dengue-2 virus induce protective CD4+ and CD8+ cells against viral encephalitis in mice. *Int Immunol* 2009.

11. Valdes I, Bernardo L, Gil L, Pavon A, Lazo L, Lopez C, Romero Y, Menendez I, Falcon V, Betancourt L, Martin J, China G, Silva R, Guzman MG, Guillen G, Hermida L. 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(2):249-58.
12. Gil L, Marcos E, Izquierdo A, Lazo L, Valdes I, Ambala P, Ochola L, Hitler R, Suzarte E, Alvarez M, Kimiti P, Ndung'u J, Kariuki T, Guzman MG, Guillen G, Hermida L. The protein DIIIC-2, aggregated with a specific oligodeoxynucleotide and adjuvanted in alum, protects mice and monkeys against DENV-2. *Immunol Cell Biol* 2015;93(1):57-66.
13. Marcos E, Gil L, Lazo L, Izquierdo A, Brown E, Suzarte E, Valdes I, Garcia A, Mendez L, Guzman MG, Guillen G, Hermida L. Purified and highly aggregated chimeric protein DIIIC-2 induces a functional immune response in mice against dengue 2 virus. *Arch Virol* 2013;158(1):225-30.
14. Valdes I, Gil L, Romero Y, Castro J, Puente P, Lazo L, Marcos E, Guzman MG, Guillen G, 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(3):455-9.
15. Marcos E, Gil L, Izquierdo A, Lazo L, Suzarte E, Valdes I, Garcia A, Perez Y, Romero Y, Brown E, Guzman G, Guillen G, Hermida L. A dose-response study in mice of the vaccine preparation containing the diiic-2 protein aggregated with the oligodeoxynucleotide 39m. *Bionatura* 2015;1(1):4-19.
16. Krug A, Rothenfusser S, Hornung V, Jahrsdorfer B, Blackwell S, Ballas ZK, Endres S, Krieg AM, Hartmann G. Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2001;31(7):2154-63.
17. Guy B, Barban V, Mantel N, Aguirre M, Gulia S, Pontvianne J, Jour-dier TM, Ramirez L, Gregoire V, Charnay C, Burdin N, Dumas R, Lang J. Evaluation of interferences between dengue vaccine serotypes in a monkey model. *Am J Trop Med Hyg* 2009;80(2):302-11.

18. Morrison D, Legg TJ, Billings CW, Forrat R, Yoksan S, Lang J. A novel tetravalent dengue vaccine is well tolerated and immunogenic against all 4 serotypes in flavivirus-naïve adults. *J Infect Dis* 2010;201(3):370-7.
19. Anderson KB, Gibbons RV, Edelman R, Eckels KH, Putnak RJ, Innis BL, Sun W. Interference and facilitation between dengue serotypes in a tetravalent live dengue virus vaccine candidate. *J Infect Dis* 2011;204(3):442-50.
20. Halstead S. *Dengue*. First ed. ed. London: Imperial College Press, 2008.
21. Rey FA, Heinz FX, Mandl C, Kunz C, Harrison SC. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* 1995;375(6529):291-8.
22. Lopez C, Gil L, Lazo L, Menendez I, Marcos E, Sanchez J, Valdes I, Falcon V, de la Rosa MC, Marquez G, Guillen G, Hermida L. In vitro assembly of nucleocapsid-like particles from purified recombinant capsid protein of dengue-2 virus. *Arch Virol* 2009;154(4):695-8.
23. Lazo L, Gil L, Lopez C, Valdes I, Marcos E, Alvarez M, Blanco A, Romero Y, Falcon V, Guzman MG, Guillen G, Hermida L. Nucleocapsid-like particles of dengue-2 virus enhance the immune response against a recombinant protein of dengue-4 virus. *Arch Virol* 2010;155(10):1587-95.
24. Volk DE, Lee YC, Li X, Thiviyanathan V, Gromowski GD, Li L, Lamb AR, Beasley DW, Barrett AD, Gorenstein DG. Solution structure of the envelope protein domain III of dengue-4 virus. *Virology* 2007;364(1):147-54.
25. Heinz FX. Epitope mapping of flavivirus glycoproteins. *Adv Virus Res* 1986;31:103-68.
26. Roehrig JT, Johnson AJ, Hunt AR, Bolin RA, Chu MC. Antibodies to dengue 2 virus E-glycoprotein synthetic peptides identify antigenic conformation. *Virology* 1990;177(2):668-75.
27. Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature* 2004;427(6972):313-9.

28. Klein DE, Choi JL, Harrison SC. Structure of a dengue virus envelope protein latestage fusion intermediate. *J Virol* 2013;87(4):2287-93.
29. Schmidt AG, Yang PL, Harrison SC. Peptide inhibitors of flavivirus entry derived from the E protein stem. *J Virol* 2010;84(24):12549-54.
30. Simmons M, Nelson WM, Wu SJ, Hayes CG. Evaluation of the protective efficacy of a recombinant dengue envelope B domain fusion protein against dengue 2 virus infection in mice. *Am J Trop Med Hyg* 1998;58(5):655-62.
31. Hermida L, Rodriguez R, Lazo L, Silva R, Zulueta A, Chinea G, Lopez C, Guzman MG, Guillen G. A dengue-2 Envelope fragment inserted within the structure of the P64k meningococcal protein carrier enables a functional immune response against the virus in mice. *J Virol Methods* 2004;115(1):41-9.
32. Lazo L, Zulueta A, Hermida L, Blanco A, Sanchez J, Valdes I, Gil L, Lopez C, Romero Y, Guzman MG, Guillen G. Dengue-4 envelope domain III fused twice within the meningococcal P64k protein carrier induces partial protection in mice. *Biotechnol Appl Biochem* 2009;52(Pt 4):265-71.
33. Vaughn DW, Green S, Kalayanaroj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Endy TP, Raengsakulrach B, Rothman AL, Ennis FA, Nisalak A. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis* 2000;181(1):2-9.
34. Welsh RM, Rothman AL. Dengue immune response: low affinity, high febrility. *Nat Med* 2003;9(7):820-2.
35. Simmons M, Murphy GS, Hayes CG. Short report: Antibody responses of mice immunized with a tetravalent dengue recombinant protein subunit vaccine. *Am J Trop Med Hyg* 2001;65(2):159-61.
36. Jennings GT, Bachmann MF. The coming of age of virus-like particles. *Biol Chem* 2008;389:521-36.
37. Patkar CG, Jones CT, Chang YH, Warriar R, Kuhn RJ. FUNCTIONAL REQUIREMENTS OF THE YELLOW FEVER VIRUS CAPSID PROTEIN. *J Virol* 2007.

38. Konishi E, Kosugi S, Imoto J. Dengue tetravalent DNA vaccine inducing neutralizing antibody and anamnestic responses to four serotypes in mice. *Vaccine* 2006;24(12):2200-7.
39. Clements DE, Collier BA, Lieberman MM, Ogata S, Wang G, Harada KE, Putnak JR, Ivy JM, McDonnell M, Bignami GS, Peters ID, Leung J, Weeks-Levy C, Nakano ET, Humphreys T. Development of a recombinant tetravalent dengue virus vaccine: immunogenicity and efficacy studies in mice and monkeys. *Vaccine* 2010;28(15):2705-15.
40. Yauch LE, Zellweger RM, Kotturi MF, Qutubuddin A, Sidney J, Peters B, Prestwood TR, Sette A, Shresta S. A protective role for dengue virus-specific CD8+ T cells. *J Immunol* 2009;182(8):4865-73.
41. van der Most RG, Murali-Krishna K, Ahmed R, Strauss JH. Chimeric yellow fever/dengue virus as a candidate dengue vaccine: quantitation of the dengue virus-specific CD8 T-cell response. *J Virol* 2000;74(17):8094-101.
42. Bernardo L, Pavon A, Hermida L, Gil L, Valdes I, Cabezas S, Linares R, Alvarez M, Silva R, Guillen G, Nagy E, Schlick P, Guzman MG. The two component adjuvant IC31((R)) potentiates the protective immunity induced by a dengue 2 recombinant fusion protein in mice. *Vaccine* 2011.
43. Yauch LE, Shresta S. Mouse models of dengue virus infection and disease. *Antiviral Res* 2008;80(2):87-93.
44. Pancharoen C, Thisyakorn U. Neurological manifestations in dengue patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2001;32(2):341-5.
45. Witayathawornwong P. Fatal dengue encephalitis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2005;36(1):200-2.
46. Lobigs M, Mullbacher A, Lee E. Evidence that a mechanism for efficient flavivirus budding upregulates MHC class I. *Immunol Cell Biol* 2004;82(2):184-8.
47. Gil L, Lopez C, Blanco A, Lazo L, Martin J, Valdes I, Romero Y, Figueroa Y, Guillen G, Hermida L. The cellular immune response plays an important role in protecting against dengue virus in the mouse encephalitis model. *Viral Immunol* 2009;22(1):23-30.

48. Yauch LE, Prestwood TR, May MM, Morar MM, Zellweger RM, Peters B, Sette A, Shresta S. CD4+ T cells are not required for the induction of dengue virus-specific CD8+ T cell or antibody responses but contribute to protection after vaccination. *J Immunol* 2010;185(9):5405-16.
49. Gunther VJ, Putnak R, Eckels KH, Mammen MP, Scherer JM, Lyons A, Sztein MB, 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(22):3895-904.
50. 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, Shresta S, Peters B, 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(22):E2046-E2053.