

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 463 966**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 14/075 (2006.01)

C12N 7/04 (2006.01)

C12N 15/861 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2011 E 11722563 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2014 EP 2563387**

54 Título: **Uso médico de vectores de vacuna de adenovirus**

30 Prioridad:

28.04.2010 EP 10290223

13.07.2010 EP 10290390

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

29.05.2014

73 Titular/es:

INSTITUT GUSTAVE ROUSSY (100.0%)

39, rue Camille Desmoulins

94800 Villejuif, FR

72 Inventor/es:

BENIHOUD, KARIM;

LANZI, ANASTASIA y

PERRICAUDET, MICHEL

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 463 966 T3

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

DESCRIPCIÓN

Uso médico de vectores de vacuna de adenovirus

La invención se refiere a vectores de vacuna a base de adenovirus para uso como vacunas mediante la administración a individuos que presentan una inmunidad anti-adenovirus preexistente.

5 Los vectores derivados de adenovirus (Ad) se han usado ampliamente en estudios preclínicos y clínicos dirigidos al cáncer o a enfermedades genéticas. Otros estudios también han investigado su uso como plataformas de vacuna contra diferentes antígenos (TATSIS & ERTL, *Mol Ther*, 10, 616-29, 2004). De este modo, el Ad recombinante mostró que induce una fuerte respuesta humoral y celular contra patógenos infecciosos tales como el Ébola (SULLIVAN y col., *PLoS Med*, 3, e177, 2006), el VIH (SHU y col., *Vaccine*, 25, 1398-408, 2007), o el virus de la Hepatitis C (MARTIN y col., *Vaccine*, 26, 2471-81, 2008), pero también contra antígenos asociados a tumores (WARNIER y col., *Int J Cancer*, 67, 303-10, 1996). Estos vectores son relativamente fáciles de construir y se pueden producir a alto título. Además, se pueden introducir por transducción en una gran gama de células y desencadenar una respuesta inmunitaria innata que ayuda en el montaje de respuestas inmunitarias a los antígenos heterólogos (BENIHOUD y col., *Gene Ther*, 14, 533-44, 2007; DESCAMPS & BENIHOUD, *Curr Gene Ther*, 9, 115-27, 2009).

10 15 La mayoría de los vectores de vacuna basados en adenovirus en seres humanos proceden de adenovirus del serotipo 5 (Ad5). La preexistencia de anticuerpos neutralizadores anti-Ad dirigidos contra Ad5 en aproximadamente del 50 al 90 % de los seres humanos (SUMIDA y col., *J Immunol*, 174, 7179-85, 2005) deteriora la transferencia de genes por estos vectores, lo cual es un requisito previo para la expresión del antígeno de interés.

20 Además, se induce una fuerte inmunidad humoral y celular anti-Ad en receptores no inmunes después de la primera administración que deteriora la eficacia de las siguientes administraciones de Ad (BENIHOUD y col., *J Virol*, 72, 9514-25, 1998; MCCOY y col., *J Virol*, 81, 6594-604, 2007). El uso de regímenes de estímulo primario-refuerzo basados en una primera administración de plásmidos seguidos por una inyección de Ad (MCCONNELL y col., *Mol Ther*, 15, 203-10, 2007) constituye una forma de aumentar la potencia de las vacunas de Ad, pero aún está limitada por las respuestas humorales anti-Ad.

25 Se han desarrollado varias estrategias para solucionar el problema asociado con las respuestas humorales anti-Ad. La mayoría de ellas aprovecharon el mejor conocimiento de la estructura de las proteínas de la cápsida, lo que permitió realizar modificaciones genéticas de componentes de la cápsida de Ad tales como proteínas de la fibra y hexón. Un primer enfoque es el desarrollo de un pseudotipo de Ad con una fibra de otro serotipo, permitiéndose así el uso de nuevos regímenes de estímulo primario-refuerzo (XIN y col., *Gene Ther*, 12, 1769-77, 2005). En segundo lugar, el reemplazo de la región hipervariable (HVR) de la proteína hexón por la de un serotipo que tiene una baja prevalencia en seres humanos permitió que el vector Ad5 escapara de los anticuerpos neutralizadores (ROBERTS y col., *Nature*, 441, 239-43, 2006). En tercer lugar, el desarrollo de vectores de Ad derivados de serotipos humanos distintos de Ad5 (VOGELS y col., *J Virol*, 77, 8263-71, 2003; LEMCKERT y col., *J Virol*, 79, 9694-701, 2005) o incluso de xenotipos amplió el conjunto de vectores que se pueden utilizar para la vacunación (FARINA y col., *J Virol*, 75, 11603-13, 2001) (TATSIS y col., *Gene Ther*, 13, 421-9, 2006).

30 Como diferentes regiones de las proteínas de la cápsida podrían acomodar péptidos sin que esto afecte al ensamblaje de la cápsida (KRASNYKH y col., *Mol Ther*, 1, 391-405, 2000), se propuso una estrategia alternativa para pasar por alto la capacidad de la respuesta humoral anti-Ad para bloquear la expresión de transgenes. Este enfoque ya no requiere la transferencia de genes para la expresión del antígeno, sino que se basa en la inserción genética del epítipo en la cápsida de Ad. La eficacia de este enfoque se demostró mediante la inserción de un epítipo neutralizador de *P. aeruginosa* en la proteína hexón, dando como resultado una respuesta humoral protectora contra la infección pulmonar por este patógeno (WORGALL y col., *J Clin Invest*, 115, 1281-9, 2005; WORGALL y col., *J Virol*, 81, 13801-8, 2007). La inserción de un epítipo de *B. anthracis* en una proteína hexón de Ad también mostró que desencadena una fuerte respuesta de anticuerpos (MCCONNELL y col., *J Virol*, 80, 5361-70, 2006). Un estudio ha analizado la influencia del sitio de inserción (el hexón, la base pentona, la protuberancia de la fibra o la proteína IX) en la inmunogenicidad del epítipo después de la administración de un Ad con la cápsida modificada. Se obtuvo la mejor respuesta humoral para un epítipo de la proteína hemaglutinina del virus de influenza A después de su inserción en la proteína de la fibra (KRAUSE y col., *J Virol*, 80, 5523-30, 2006). Sin embargo, como los Ad con la cápsida modificada se inyectaron solo una vez, no se investigó la influencia del número de administraciones en la eficacia de la vacuna.

Sumario de la invención:

55 En el estudio que lleva a la presente invención, los inventores caracterizaron mejor la influencia del número y del sitio de inserción del epítipo sobre su inmunogenicidad después de una o varias administraciones de Ad con la cápsida modificada. Para este propósito, se insertó genéticamente OVA₃₂₃₋₃₃₉, un epítipo que proviene de la ovoalbúmina que contiene un epítipo de linfocito B (RENZ y col., *J Immunol*, 151, 7206-13, 1993; FIFIS y col., *Vaccine*, 23, 258-66, 2004), en el hexón de Ad (AdH-3OVA2 y AdH-OVA) o en las proteínas de la fibra (AdF-3OVA2 y AdF-OVA) de Ad recombinante.

Después de una administración intraperitoneal, todos los virus desencadenaron una respuesta eficiente anti-ovoalbúmina que duró más de 60 días, siendo el más eficiente AdH-3OVA2. Se obtuvieron niveles comparables de Ac anti-ovoalbúmina con AdF-3OVA2 o una dosis 10 veces más baja de AdH-3OVA2, lo que sugiere un papel directo del número de epítomos en la eficacia de la vacunación. Por el contrario y sorprendentemente, después de dos inyecciones, las respuestas de Ac anti-ovoalbúmina aumentaron de forma espectacular en ratones en los que se inyectó Ad con la fibra modificada en comparación con Ad con el hexón modificado. La transferencia pasiva de suero de ratones inmunes a Ad antes de la exposición a Ad que presentaba el epítipo OVA en la proteína de la fibra o en la del hexón, ayudó a demostrar el papel de los Ac anti-Ad en el aumento o la reducción de la producción de Ac anti-ovoalbúmina, respectivamente.

- 5
- 10 Los resultados de los presentes inventores demostraron que la respuesta humoral anti-epítipo no solamente estaba influenciada por el número de epítomos por cápsida, sino también por la inmunidad anti-Ad preexistente, y subrayan que la proteína de la fibra constituye un sitio mejor para la inserción del epítipo en individuos que presentan inmunidad anti-Ad.

La invención, en su sentido más amplio, es como se caracteriza en las reivindicaciones independientes.

- 15 La invención, por lo tanto, proporciona un adenovirus recombinante de replicación defectuosa que tiene uno o más polipéptidos heterólogos que contienen uno o más epítomos diana insertados en su proteína de la fibra, para su uso como una vacuna que genera una respuesta inmunitaria contra dichos epítomos diana, caracterizado porque dicho adenovirus para dicho uso es para la administración a un sujeto que tiene una inmunidad humoral preexistente contra un adenovirus.
- 20 El adenovirus recombinante de replicación defectuosa se puede obtener a partir de diferentes tipos de adenovirus de replicación defectuosa diseñados para terapia humana o animal, que son conocidos en sí mismos (para revisión, véase por ejemplo (DESCAMPS & BENIHOUD, Curr Gene Ther, 9, 115-27, 2009) mediante la inserción genética de uno o más polipéptidos heterólogos que contienen el epítipo o los epítomos diana en la proteína de la fibra de dicho adenovirus. Preferentemente, proviene de un adenovirus de replicación defectuosa que tiene el mismo serotipo que el adenovirus contra el cual el sujeto que recibe la vacuna ha desarrollado una inmunidad humoral. Por ejemplo, en el caso de un sujeto humano, el adenovirus recombinante de replicación defectuosa se obtendrá generalmente a partir de Ad2 o de Ad5, preferentemente de Ad5. La inmunidad anti-adenovirus también podría ser el resultado de un tratamiento anterior con un vector basado en adenovirus; en este caso, el adenovirus recombinante de replicación defectuosa se obtendrá a partir de un adenovirus del mismo serotipo que dicho vector usado anteriormente.
- 25
- 30 La inmunidad humoral preexistente a un adenovirus de un serotipo dado puede determinarse fácilmente usando procedimientos bien conocidos en la técnica para detectar la presencia de anticuerpos dirigidos contra dicho serotipo.

Ventajosamente, el adenovirus recombinante de replicación defectuosa para su uso como una vacuna de acuerdo con la invención puede ser para la administración a un sujeto que ha recibido previamente un adenovirus recombinante de replicación defectuosa del mismo serotipo, que contiene el mismo o los mismos epítomos diana insertados en una proteína de la cápsida distinta de la proteína de la fibra, preferentemente en la proteína hexón.

- 35
- 40 De acuerdo con una realización preferida, dicho adenovirus recombinante de replicación defectuosa es para su uso como una vacuna que genera una respuesta inmunitaria contra dicho o dichos epítomos diana, caracterizado porque dicho adenovirus para dicho uso es para administraciones repetidas (es decir, por lo menos dos administraciones sucesivas) a un mismo sujeto. En este caso también puede ser para dicho uso incluso en un sujeto que antes de la primera administración, no tenía inmunidad humoral al anti-adenovirus contra el serotipo del que proviene dicho adenovirus de replicación defectuosa.

La invención también proporciona un adenovirus recombinante de replicación defectuosa que tiene uno o más polipéptidos heterólogos que contienen uno o más epítomos diana insertados en su proteína de la fibra y uno o más polipéptidos heterólogos que contienen el mismo o los mismos epítomos diana insertados en una proteína de la cápsida distinta de la proteína de la fibra, preferentemente en la proteína hexón, para su uso como una vacuna que genera una respuesta inmunitaria contra dicho o dichos epítomos diana, caracterizado porque dicho adenovirus para dicho uso es para administraciones repetidas al mismo sujeto. Este adenovirus para dicho uso puede ser ventajosamente para administraciones repetidas, en particular, en sujetos que no tienen inmunidad humoral anti-adenovirus preexistente contra el serotipo del que proviene dicho adenovirus de replicación defectuosa. La primera administración permite obtener una fuerte respuesta inmunitaria contra el o los epítomos diana presentados en la proteína de la cápsida distintos de la proteína de la fibra, mientras que la siguiente o siguientes administraciones permiten reforzar adicionalmente la respuesta inmunitaria debido a la presentación del epítipo o epítomos diana en la proteína de la fibra.

- 45
- 50
- 55 También se conocen en la técnica procedimientos para la modificación genética de proteínas de la cápsida de Ad, así como sitios permitidos, es decir, sitios adecuados para la inserción de polipéptidos heterólogos en dichas proteínas sin que eso afecte el ensamblaje de la cápsida (véase, por ejemplo, KRASNYKH y col., 2000, citado anteriormente). En el caso de las proteínas de la fibra, los sitios de inserción preferidos están generalmente

5 localizados en la protuberancia de la fibra, por ejemplo, añadidos al extremo C terminal de la protuberancia de la fibra, o en el bucle HI de la protuberancia, como se describe, por ejemplo, por BELOUSOVA y col., (J Virol, 76, 8621-31, 2002); en el caso de las proteínas hexón, los sitios de inserción preferidos están generalmente localizados en los bucles hipervariables, por ejemplo en HVR5 o HVR2 (WU y col., J Virol, 79, 3382-90, 2005). Los polipéptidos heterólogos se pueden insertar dentro de la secuencia endógena del adenovirus o en sustitución de parte de dicha secuencia.

10 Opcionalmente, la inserción del o de los polipéptidos heterólogos se puede combinar con otras modificaciones de las proteínas de la cápsida viral, por ejemplo modificaciones que influyen en el tropismo viral (y que posiblemente reducen la toxicidad viral). A modo de ejemplo no limitativo de tales modificaciones, se puede mencionar: la pseudotipificación con la proteína de la fibra de un adenovirus de otro serotipo, la eliminación del motivo RGD de la base pentona que es responsable de la interacción con integrinas, la modificación de los restos de aminoácidos de la proteína de la fibra que participan en la interacción con el receptor CAR o con los sulfatos de heparina. Una modificación particularmente preferida es la eliminación del bucle HVR5 de la proteína hexón, como se desvela en el documento PCT WO 2007/148148; si es necesario, dicho bucle puede reemplazarse por un polipéptido heterólogo que contiene uno o más epítopos diana, como se ha descrito anteriormente.

15 En el presente documento, un "polipéptido heterólogo" se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia distinta de la secuencia de la proteína de la fibra adenoviral o a un fragmento del mismo. Preferentemente, dicho polipéptido heterólogo tiene por lo menos 5, más preferentemente por lo menos 8, y aún más preferentemente por lo menos 10 aminoácidos de longitud; puede ser de hasta 200, preferentemente de hasta 100, más preferentemente de hasta 50 y ventajosamente de hasta 25 aminoácidos de longitud. Opcionalmente, dos o más polipéptidos heterólogos se pueden insertar en la proteína de la fibra en dos o más sitios permitidos diferentes, por ejemplo en el extremo C terminal y en el bucle HI de la protuberancia. De la misma manera, dos o más polipéptidos heterólogos se pueden insertar en la proteína hexón en dos o más sitios permitidos diferentes, por ejemplo en el bucle HVR5 y en el bucle HVR2. En estos casos, el tamaño global de los insertos dentro de la proteína de la fibra o de la proteína hexón debe seguir siendo preferentemente de menos de 100 aminoácidos de longitud. Cada polipéptido heterólogo puede comprender uno o más epítopos diana contra los cuales se pretende inducir una respuesta inmunitaria. Los epítopos pueden provenir de un mismo antígeno o de antígenos diferentes.

20 El antígeno puede ser, por ejemplo, un antígeno de un agente infeccioso (incluyendo bacterias, virus, hongos y protozoos) o un antígeno tumoral. El epítipo diana puede ser un epítipo de un linfocito B o T, preferentemente un epítipo de un linfocito B.

25 También se desvelan procedimientos para generar una respuesta inmunitaria contra uno o más epítopos diana en un sujeto.

30 De acuerdo con un primer aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para generar una respuesta inmunitaria contra uno o más epítopos diana en un sujeto que tiene una inmunidad humoral preexistente contra un adenovirus, en el que dicho procedimiento comprende administrar a dicho sujeto un adenovirus recombinante de replicación defectuosa que tiene uno o más polipéptidos heterólogos que contienen dicho o dichos epítopos diana insertados en su proteína de la fibra.

35 De acuerdo con un segundo aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para generar una respuesta inmunitaria contra uno o más epítopos diana en un sujeto que tiene o no una inmunidad humoral preexistente contra un adenovirus, en el que dicho procedimiento comprende:

- a) administrar a dicho sujeto un adenovirus recombinante de replicación defectuosa que tiene uno o más polipéptidos heterólogos que contienen dicho o dichos epítopos diana insertados en su proteína de la fibra; y
- b) volver a administrar dicho adenovirus recombinante de replicación defectuosa por lo menos una vez a dicho sujeto.

40 Debido al hecho de que la primera administración del adenovirus recombinante de replicación defectuosa induce inmunidad anti-adenoviral, si se desea, este segundo aspecto puede utilizarse en un sujeto que no tenga inmunidad humoral preexistente contra un adenovirus antes de dicha primera administración.

45 De acuerdo con un tercer aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para generar una respuesta inmunitaria contra uno o más epítopos diana en un sujeto que tiene o no una inmunidad humoral preexistente contra un adenovirus, en el que dicho procedimiento comprende:

- a) administrar a dicho sujeto un primer adenovirus recombinante de replicación defectuosa que tiene uno o más polipéptidos heterólogos que contienen dicho o dichos epítopos diana insertados en una proteína de la cápsida distinta de la proteína de la fibra, preferentemente en la proteína hexón;
- b) administrar a dicho sujeto un adenovirus recombinante de replicación defectuosa del mismo serotipo que el primero, que tiene uno o más polipéptidos heterólogos que contienen el mismo o los mismos epítopos diana insertados en su proteína de la fibra; y
- c) opcionalmente, volver a administrar dicho adenovirus recombinante de replicación defectuosa por lo menos una vez a dicho sujeto.

De acuerdo con un cuarto aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para generar una respuesta inmunitaria contra uno o más epítomos diana en un sujeto que tiene o no una inmunidad humoral preexistente contra un adenovirus, en el que dicho procedimiento comprende:

- 5 a) administrar a dicho sujeto un primer adenovirus de replicación defectuosa que tiene uno o más polipéptidos heterólogos que contienen uno o más epítomos diana insertados en su proteína de la fibra y uno o más polipéptidos heterólogos que contienen el mismo o los mismos epítomos diana insertados en una proteína de la cápsida distinta de la proteína de la fibra, preferentemente en la proteína hexón;
- b) administrar a dicho sujeto un adenovirus recombinante de replicación defectuosa del mismo serotipo que el primero, seleccionado entre:
 - 10 i) el mismo adenovirus recombinante de replicación defectuosa que el que se usó en la primera administración;
 - ii) un adenovirus recombinante de replicación defectuosa que tiene uno o más polipéptidos heterólogos que contienen el mismo o los mismos epítomos diana insertados en su proteína de la fibra; y ningún epítomo diana insertado en otra proteína de la cápsida que no es la proteína de la fibra; y
- 15 c) opcionalmente, volver a administrar dicho adenovirus recombinante de replicación defectuosa por lo menos una vez a dicho sujeto.

Los procedimientos de acuerdo con el tercer y cuarto aspectos pueden usarse de manera ventajosa en sujetos que no tienen inmunidad humoral preexistente contra un adenovirus. En este caso, la primera administración permite tanto obtener una fuerte respuesta inmunitaria contra el o los epítomos diana presentados en la proteína de la cápsida distinta de la proteína de la fibra como inducir una inmunidad anti-adenoviral, mientras que la administración o administraciones posteriores permiten reforzar aún más la respuesta inmunitaria debido a que se presenta el o los epítomos diana en la proteína de la fibra.

Ventajosamente, el adenovirus para su uso como una vacuna de acuerdo con la invención es para su uso después de una fase anterior en la cual se determina la presencia o la ausencia en el sujeto a tratar de anticuerpos contra adenovirus del serotipo del adenovirus recombinante de replicación defectuosa que se va a usar.

Las vías de administración, la dosificación y la frecuencia del adenovirus recombinante de replicación defectuosa para su uso como una vacuna de acuerdo con la invención se seleccionarán dependiendo del sujeto, de la enfermedad a tratar o prevenir mediante la generación de una respuesta inmunitaria y del serotipo de los adenovirus que se administran. En general, se administrarán mediante inyección (por ejemplo, intracutánea, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal o subcutánea), sin embargo, se pueden usar otras vías de administración tales como la administración oral, intranasal, vaginal o rectal. Típicamente, y a modo de ejemplos no limitantes, la cantidad de partículas virales para cada administración puede variar de aproximadamente 10^7 a 10^{10} partículas, y el número de administraciones puede variar de 2 a 6, separándose dos administraciones consecutivas generalmente por intervalos de aproximadamente 15 días a 2 meses.

35 **Legendas de las Figuras**

Fig. 1 Detección de epítomos en un Ad con la cápsida modificada. (A) Tinción con plata del Ad con la cápsida modificada. Se separaron 10^{10} pv (partículas virales) de un Ad de control (AdTS) o de un Ad con la cápsida modificada (AdH-3OVA2, AdH-OVA, AdF-3OVA2, AdF-OVA) en un gel de poliacrilamida al 10 %. Se identifican los principales componentes de la cápsida (flecha negra) y se indica la diferencia entre la fibra modificada o la fibra nativa (flecha blanca). (B y C) Detección de epítomos OVA y 3OVA2 en viriones. Las placas ELISA se recubrieron con 100 ng de virus nativos (B) o desnaturalizados (C) y se incubaron con un anticuerpo policlonal de conejo contra la proteína ovoalbúmina. La unión se detectó con un anticuerpo secundario conjugado con HRP. Se muestra uno de dos experimentos, $n = 6$; media + DT de seis repeticiones de las placas.

Fig. 2 Transferencia génica *in vitro* mediante Ad con la cápsida modificada. Se infectaron células CHO-CAR de manera simulada (PBS) o se infectaron a MDI crecientes AdTS recombinante con *lacZ*, AdH-OVA, AdH-3OVA2, AdF-OVA y AdF-3OVA2. La actividad β -Gal, expresada como URL/ μ g de proteína, se midió en lisados celulares 24 h más tarde. Los experimentos realizados por duplicado se llevaron a cabo dos veces y se muestran resultados representativos.

Fig. 3 Cinética de la respuesta humoral anti-ovoalbúmina. Se inmunizaron ratones C57B1/6 por vía intraperitoneal con 10^{10} pv de un Ad de control (AdTS) o de un Ad con la cápsida modificada (AdH-3OVA2, AdH-OVA, AdF-3OVA2 o AdF-OVA). Se determinaron los títulos de IgG anti-ovoalbúmina mediante ELISA en diferentes días después de la inyección (p.i.). Los títulos de Ab por debajo de 100 se representaron como 50. Se muestra uno de los dos experimentos, los círculos y las barras representan los resultados de ratones individuales ($n = 6$) y las medias, respectivamente.

Fig. 4 Caracterización de isotipos de Ab anti-ovoalbúmina. Se inmunizaron ratones C57B1/6 por vía intraperitoneal con 10^{10} pv de un Ad de control (AdTS) o de un Ad con la cápsida modificada (AdH-3OVA2, AdH-OVA, AdF-3OVA2 o AdF-OVA). Se determinaron los títulos de IgG1, IgG2a e IgG2b anti-ovoalbúmina mediante ELISA en el día 21 p.i. Los títulos Ab menores de 100 se representaron como 50. Se muestra uno de dos experimentos, $n = 6$; media + DT.

Fig. 5 Dependencia de la dosis de la respuesta humoral anti-ovoalbúmina. Se inmunizaron ratones C57B1/6 por vía intraperitoneal con 10^9 o 10^{10} pv de AdH-3OVA2 o de AdF-3OVA2. Se determinaron los títulos de IgG anti-ovoalbúmina mediante ELISA el día 14 p.i. Se muestra uno de dos experimentos, los círculos y las barras representan los resultados de ratones individuales (n= 6) y medias, respectivamente.

Fig. 6 Administración repetida de Ad con la cápsida modificada. Se inmunizaron ratones C57B1/6 por vía intraperitoneal dos veces con dos semanas de diferencia con 10^{10} pv de AdTS o con Ad con la cápsida modificada y se recogieron los sueros el día 14 p.i. Se determinaron los títulos de IgG anti-ovoalbúmina, anti-βgal y anti-Ad mediante ELISA el día 14 p.i. Los títulos de Ab menores de 100 se representaron como 50. Se muestra uno de dos experimentos, los círculos y las barras representan los resultados de ratones individuales (n = 6) y las medias, respectivamente.

Fig. 7 Respuestas anti-ovoalbúmina después de varias administraciones de virus. En ratones C57B1/6 se inyectaron por vía intraperitoneal cuatro veces con dos semanas de diferencia 10^{10} de pv de AdTS o Ad con la cápsida modificada y se recogieron los sueros el día 14 después de cada inyección. Los títulos de Ab menores de 100 se representaron como 50. Se muestra uno de dos experimentos, los círculos y las barras representan los resultados de ratones individuales (n = 6) y las medias, respectivamente.

Fig. 8 Respuestas anti-ovoalbúmina después de la administración subcutánea de Ad con la cápsida modificada. En ratones C57B1/6 se inyectaron por vía subcutánea dos veces, con dos semanas de diferencia, 10^{10} pv de AdTS o con Ad con la cápsida modificada y se recogieron los sueros el día 14 p.i. Los títulos de Ab menores de 100 se representaron como 50. Se muestra uno de dos experimentos, los círculos y las barras representan los resultados de ratones individuales (n = 6) y las medias, respectivamente.

Fig. 9 Influencia de la inmunidad anti-Ad en la respuesta humoral anti-ovoalbúmina. (A) En ratones C57B1/6 en los que se había inyectado AdTS o inyectados de forma simulada se inyectaron dos semanas después AdH-3OVA2 o AdF-3OVA2 (10^{10} pv). Se determinaron los títulos de IgG anti-ovoalbúmina mediante ELISA el día 14 p.i. Los títulos de Ab menores de 100 se representaron como 50. Se muestra uno de dos experimentos, los círculos y las barras representan los resultados de ratones individuales (n = 6) y las medias, respectivamente. Se transfirieron de forma adoptiva esplenocitos (B), linfocitos CD4⁺ (C), linfocitos CD8⁺ (D) o suero (E) de ratones inyectados de forma simulada o de ratones en los que se había inyectado AdTS en ratones ingenuos antes de la inyección intraperitoneal de AdH-3OVA2 o de AdF-3OVA2 (10^{10} pv). Se determinaron los títulos de IgG anti-ovoalbúmina mediante ELISA el día 14 p.i. Los títulos de Ab menores de 100 se representaron como 50. Los círculos y las barras representan los resultados de ratones individuales (n = 6) y las medias, respectivamente.

Fig. 10 Neutralización de Ad con la cápsida modificada por Ab anti-Ad. Se mezclaron virus AdTS o virus con la cápsida modificada (AdH-3OVA2 o AdF-3OVA2) con diluciones seriadas de suero anti-Ad y luego se incubaron con células 293A. Se midió la actividad βgal un día después y se expresó como porcentaje de transducción con respecto a las células infectadas con el virus solo.

Fig. 11 Enmascaramiento del epítipo de 3OVA2 por Ab anti-Ad. Se incubaron AdTS, AdH-3OVA2 o AdF-3OVA2 aplicados como un recubrimiento en una placa de 96 pocillos con suero de ratones ingenuos o ratones inmunes a Ad y se evaluó la accesibilidad del epítipo 3OVA2 usando Ab anti-ovoalbúmina. Se expresó la detección del epítipo 3OVA2 en viriones en diferentes condiciones de incubación con respecto a la detección de 3OVA2 en virus incubados con suero de control. Se muestra uno de dos experimentos, los histogramas representan medias ± DT (n = 10).

Fig. 12 Comparación de Ad con la cápsida modificada con un Ad recombinante que expresa la ovoalbúmina como un transgén. Se inmunizaron ratones C57BL/6 dos veces con dos semanas de diferencia por vía intraperitoneal con 10^{10} pv de Ad con la cápsida modificada (AdH-3OVA2 o AdF-3OVA2) o con AdTS-Ovalb, que expresa la ovoalbúmina como un transgén. Los sueros se recogieron el día 14 p.i. y se determinaron los títulos de IgG anti-ovoalbúmina mediante ELISA. Los títulos de Ab menores de 100 se representaron como 50. Se muestra uno de dos experimentos, los círculos y las barras representan los resultados de ratones individuales (n = 6) y las medias, respectivamente.

Fig. 13 Respuestas anti-ovoalbúmina después de la estimulación inicial y del refuerzo con diferentes Ad con la cápsida modificada. Se inmunizaron ratones C57BL/6 por vía intraperitoneal dos veces con dos semanas de diferencia con 10^{10} pv de Ad con la cápsida modificada (AdH-3OVA2 o AdF-3OVA2) o se inmunizaron en primer lugar con AdH-3OVA2 y en segundo lugar con AdF-3OVA2. Los sueros se recogieron el día 14 p.i. y se determinaron los títulos de IgG anti-ovoalbúmina mediante ELISA. Los títulos de Ab menores de 100 se representaron como 50. Se muestra uno de dos experimentos, los círculos y las barras representan los resultados de ratones individuales (n = 6) y las medias, respectivamente.

Descripción detallada de la invención

Materiales y procedimientos

Vectores adenovirales

El AdTS de control recombinante con LacZ (AE18 en la ref. (VIGNE y col., J Virol, 73, 5156-61, 1999)) provenía de Ad5 con las regiones E1 y E3 eliminadas. El AdH-OVA y el AdH-3OVA2, que provienen de AdTS, contienen respectivamente un péptido corto (OVA₃₂₃₋₃₃₉: ISQAVHAAHAEINEAGR (SEC ID N°: 1), al que se hace referencia en el texto como péptido OVA) o uno largo (OVA₃₂₀₋₃₄₁: SLKISQAVHAAHAEINEAGREV (SEC ID N°: 2), al que se hace referencia en el texto como péptido 3OVA2) procedentes de la ovoalbúmina. Estos péptidos se insertaron en la

proteína hexón en lugar de ²⁶⁹TTEAAAGNGDNL²⁸¹ (SEC ID N°: 3) de la región hipervariable 5. AdF-OVA y AdF-3OVA2 contienen respectivamente un péptido OVA o 3OVA2 insertado en lugar de T_{539Q}ETGDTTPS₅₄₈ (SEC ID N°: 4) en el bucle HI de la proteína de la fibra. Todos los virus modificados (Tabla 1) se construyeron usando clonación de tipo recombinacional en *E. coli* (CROUZET y col., Proc Natl Acad Sci U S A, 94, 1414-9, 1997).

5

Tabla 1

Virus	Proteína modificada	Adaptador	Péptido insertado (SEC ID N°: #)	Adaptador	Título ($\times 10^{12}$ pv/ml)
AdTS	-	-	-	-	7,5 \pm 0,6
AdH-OVA	hexón	G	ISQAVHAAHAEINEAGR (1)	LGG	5,9
AdH-3OVA2	hexón	G	SLKISQAVHAAHAEINEAGREV (2)	LGG	7,9 \pm 1,4
AdF-OVA	fibra	SS	ISQAVHAAHAEINEAGR (1)	GSS	9,5
AdF-3OVA2	fibra	SS	SLKISQAVHAAHAEINEAGREV (2)	GSS	8,1 \pm 0,4

Todos los virus se obtuvieron utilizando procedimientos convencionales descritos (MARTIN y col., Mol Ther, 8, 485-94, 2003), se almacenaron a -80 °C en PBS-glicerol al 7 % y se titularon mediante espectrofotometría ($1 \text{ DO}_{260} = 1,1 \times 10^{12}$ partículas virales (pv)/ml).

Oligonucleótidos

10 Los oligonucleótidos usados para la inserción y la detección por PCR de las secuencias de nucleótidos que codifican los epítopos 3OVA2 y OVA están descritos en la Tabla 2.

Tabla 2

Nombre	Secuencia de nucleótidos (SEC ID N.º: #)	Diana
Hex	5'- atgggatgaagctgtactg -3' (5)	Hexón
IM21A	5'-ggcatactcaagctgtccatgcagcacatgcagaatacaatgaagcaggcagactggcgccc-3' (6)	OVA en hexón
IM21B	5'- ttagggcccaagtctgctgtcttcaatgatttctgcatgctgacagcttgagatatgcc- 3' (7)	OVA en hexón
IM22A	5'-ggcagcctgaagatatctcaagctgtccatgcagcacatgcagaaatacaatgaagcaggcagagaggtgctggcgccc-3' (8)	30VA2 en hexón
IM22B	5'- ttagggcccaagcaccctctgctgttcatgatttctgcatgctgcatggacagcttgagatatcttcaggctgcc- 3' (9)	30VA2 en hexón
HigU1	5'- cagctccatctcctaactgtagactaaatg -3' (10)	Fibra
IM23A	5'-gtaaccctaacctaccactaaacggttctagcactatctcaagctgtccatgcagcacatgcagaaatacaatgaagcaggagc-3' (11)	OVA en la fibra
IM23B	5'-gctagaaccctgcccgttcatgatttctgcatgctgcatggacagctgagatatgctagaaccgttttagttagttagg- 3' (12)	OVA en la fibra
IM24A	5'-gtaaccctaacctaccactaaacggctgagcagcctgaagatatctcaagctgtccargcagcacatgcagaaatacaatgaagcaggcagagaggtggttctagc-3'(13)	30VA2 en la fibra
IM24B	5'-gctagaaccctgcccgttcatgatttctgcatgctgcatggacagcttgagatatcttcaggcttagaaccgttttagttagttagg-3 (14)	30VA2 en la fibra

Detección por PCR de secuencias que codifican el epítipo

Se extrajo ADN adenoviral a partir de AdTS purificado y de virus con la cápsida modificada y se determinaron las concentraciones de ADN mediante DO260. Los cebadores usados en las reacciones de PCR (Tabla 2) son los siguientes: Hex e IM21B para AdH-OVA, Hex e IM22B para AdH-3OVA2, HigU1 e IM23B para AdF-OVA, HigU1 e IM24B para AdF-3OVA2. Las mezcla de amplificación contenía dNTP 200 μ M, 0,5 μ M de cada cebador, 1,5 U de Taq Polimerasa (Biolabs, Ipswich, MA), tampón TaqPol 1 X y 150 ng de ADN total. La reacción se inició con una etapa de desnaturalización de 4 min a 94 °C. La amplificación se produjo durante 30 ciclos, consistiendo cada ciclo en 1 min a 94 °C, 1 min a 53 °C y 2 min a 72 °C. Los productos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en gel.

10 Análisis de SDS-PAGE y de tinción con plata

Se resuspendieron virus purificados (10^{10} pv) en tampón de lisis de Laemmli, se hirvieron durante 5 min y se cargaron en un gel NuPage al 10 % (Novex, Invitrogen, CA). Después de la electroforesis, el gel se tiñó con un kit de tinción de plata (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Detección de epítipos OVA y 3OVA2 en viriones

15 Para evaluar si los epítipos estaban presentes o eran accesibles en la superficie de la cápsida, se recubrieron placas de 96 pocillos con virus desnaturalizados o nativos (Nunc, Roskilde, Dinamarca). Los virus se inactivaron a 56 °C durante 30 minutos y se añadió SDS al 0,1 %. Se realizó una lectura espectrofotométrica a 215 y a 225 nm para determinar las concentraciones de virus y se aplicaron 100 ng como un recubrimiento en placas de 96 pocillos. Como alternativa, se aplicaron como recubrimientos las mismas cantidades de virus nativos. Después de incubarlos durante una noche a 4 °C, los sitios no específicos se bloquearon con PBS-Tween en leche al 5 %, y después las placas se lavaron y se incubaron durante 1 hora con un anticuerpo policlonal de conejo contra la proteína ovoalbúmina (AB1225, Millipore, MA). Después del lavado, se añadió durante 1 hora un Ab anti-IgG de conejo unido a peroxidasa (NA934, Amersham Biosciences, Saclay, Francia) y la actividad peroxidasa se reveló mediante incubación durante 30 min con el sustrato diclorhidrato de o-Fenilendiamina (Sigma-Aldrich, Lyon, Francia). La reacción se detuvo mediante la adición de HCl 3 N y se realizó la lectura espectrofotométrica a 490 nm.

20 El enmascaramiento de los epítipos derivados de la ovoalbúmina por Ab anti-Ab se investigó como sigue. Se recubrieron placas de 96 pocillos (Nunc) con virus (10^9 pv) y se añadieron diluciones de suero procedente de ratones en los que se había inyectado dos veces AdTS. Como controles se usaron sueros de ratones pre-inmunes. Después de una incubación de una hora, las placas se lavaron y se incubaron con Ab policlonal de conejo anti-ovoalbúmina (AB1225) durante una noche a 4 °C. La unión del Ab anti-ovoalbúmina se reveló como se ha descrito anteriormente.

Células

Las células 239A se conservaron como se recomienda por Invitrogen. Las células CHO-CAR, proporcionadas amablemente por el Dr. Bergelson, se han descrito previamente (BERGELSON y col., Science, 275, 1320-3, 1997).

Transducción de CHO-CAR

35 Todos los experimentos se realizaron en placas de 12 pocillos (Corning Glass Works, Coming, NY) y se ensayaron por duplicado. Se infectaron monocapas de células confluentes de células CHO-CAR con MDI crecientes (10^1 , 10^2 y 10^3 pv/célula) de AdTS o de virus con la cápsida modificada en 400 μ l de medio libre de suero. Una hora más tarde se añadieron 2 ml de medio completo. Después de 24 h, se lisaron las células y se midió la actividad β -galactosidasa (β -gal) usando un ensayo quimioluminiscente (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA). El contenido de proteína se determinó usando un Ensayo de Proteína Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Marnes-la-Coquette, Francia). Los resultados se expresan como unidades relativas de luz (URL) por μ g de proteína.

Ratón

45 Se adquirieron ratones C57BL/6 hembra de 7 semanas de edad de Janvier (Le Gesnest Saint Isle, Francia) o de Harlan (Gannat, Francia). Se acondicionaron en las instalaciones de los animales al menos durante una semana antes de empezar los experimentos. Todos los experimentos con animales se aprobaron por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL).

Experimentos *in vivo*

50 Se inyectaron por vía intraperitoneal virus de control o virus con la cápsida modificada (10^9 o 10^{10} pv) en PBS (200 μ l). Se administraron inyecciones repetidas en intervalos de 2 semanas (número total de inyecciones entre 2 y 4). Se recogieron muestras de sangre antes y en diferentes intervalos después de la inyección del virus. Los sueros de los ratones se prepararon y se analizaron para determinar la presencia de anticuerpos anti-ovoalbúmina, anti- β galactosidasa (β gal) y anti-Ad mediante ELISA como se describe a continuación.

Experimentos de transferencia celular y sérica

Para los experimentos de transferencia sérica y a esplenocitos, en los ratones se inyectaron por vía intraperitoneal, dos veces con dos semanas de diferencia, AdTS (10^{10} pv en 200 μ l de PBS) o PBS (200 μ l). El día 15 después de la segunda inyección, los ratones se sacrificaron y se extrajeron los bazo. Los bazo se trituraron en medio RPMI suplementado con SVF al 5 %, aminoácidos no esenciales al 1 %, glutamina al 1 %, piruvato al 1 % y β -mercaptoetanol 5×10^{-5} M, y se filtraron a través de un colador celular de 100 μ m. Después de retirar las células sanguíneas mediante tampón de lisis ACK (Invitrogen, Cergy-Pontoise, Francia), las células se resuspendieron y se ajustó la concentración a 5×10^7 células/ml. En paralelo, se prepararon sueros a partir de la sangre. El suero (diluido a un tercio en PBS) o los esplenocitos (10^7 esplenocitos en 200 μ l de medio RPMI) se inyectaron por vía intravenosa en el plexo retroorbital de los ratones. Al día siguiente, en los ratones se inyectó por vía intraperitoneal AdH-3OVA2 o AdF-3OVA2 (10^{10} pv). Se tomaron muestras de sangre el día 15 después de la inyección de Ad. Se prepararon los sueros de los ratones y se analizaron con respecto a la presencia de anticuerpos anti-ovoalbúmina, anti- β gal y anti-Ad mediante ELISA como se describe a continuación.

Para los experimentos de transferencia a linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, se prepararon esplenocitos como se ha descrito anteriormente y se resuspendieron en 1 ml de medio RPMI complementado. Después, se añadieron Ab anti-CD3 PE-Cy7 (eBioscience, CA, Estados Unidos), anti-CD19 APC (eBioscience) y anti-NK-1.1 APC (BD Bioscience) durante 30 minutos a 4 °C. Después del lavado, las células se resuspendieron, se filtraron a través de un colador de células de 40 μ m y se les añadió 7-AAD (BD Bioscience). Las células CD3⁺ se clasificaron en un citómetro DakoCytomation MoFlo (Beckman Coulter, Villepinte, Francia) y se recogieron. Después de centrifugarlas, las células se resuspendieron en 1 ml de medio RPMI complementado y se incubaron con Ab anti-CD4 PE y anti-CD8 FITC (BD Bioscience) durante 30 minutos a 4 °C. Después de clasificar las células se obtuvieron dos fracciones correspondientes a linfocitos T CD4⁺CD3⁺ y CD8⁺CD3⁺. Se inyectaron por vía intravenosa en el plexo retroorbital de los ratones linfocitos T CD4⁺ (2×10^6) o CD8⁺ (10^6) en 200 μ l de medio RPMI. Al día siguiente, en los ratones se inyectó por vía intraperitoneal AdH-3OVA2 o AdF-3OVA2 (10^{10} pv/ratón). Se tomaron muestras de sangre el día 15 después de la inyección de Ad.

Determinación de anticuerpos específicos

Los anticuerpos específicos de ovoalbúmina en el suero se determinaron mediante ELISA. Después de recubrir las placas de 96 pocillos (Nunc) con 1 μ g de proteína de ovoalbúmina (Calbiochem, Merck Chemicals, Nottingham, Inglaterra), se añadieron diluciones seriadas del suero en PBS-Tween con leche al 5 %. El anticuerpo unido se detectó con anticuerpos de cabra anti-ratón de los isotipos de IgG, IgG1, IgG2a o IgG2b conjugados con peroxidasa (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL). La peroxidasa se reveló mediante incubación con el sustrato diclorhidrato de o-Fenilendiamina (Sigma-Aldrich) durante 30 min. La reacción se detuvo añadiendo HCl 3 N y se realizó una lectura espectrofotométrica a 490 nm. Los anticuerpos específicos de β -gal y de Ad en el suero se determinaron mediante ELISA como se ha descrito previamente (BENIHOUD y col., Gene Ther, 14, 533-44, 2007). Los títulos se calcularon como diluciones recíprocas de dos veces 2 por encima de los valores de fondo.

Ensayo de anticuerpo neutralizador anti-adenoviral

Se mezclaron virus de tipo silvestre recombinantes con LacZ o virus con la cápsida modificada con diluciones seriadas de muestras de suero de ratones pre-inmunes o inmunes a Ad descomplementados durante 30 min a 56 °C. Después, tras una hora de incubación a 37 °C, la mezcla se incubó con células 293A (40.000 células/pocillo, multiplicidad de infección de 50) en placas de 96 pocillos durante 1 h a 37 °C. Después se añadieron 100 μ l de medio completo y las células se cultivaron durante 19 h. Las células se lavaron y se incubaron con 100 μ l de tampón de lisis (Na₂HPO₄ 6 mM, KCl 10 mM, MgSO₄ 0,1 mM, 2-mercaptoetanol 50 mM y Triton X-100 al 0,5 %) que contenía 0,1 mg de sustrato de β gal (4-metil-umbeliferilb-D-galactósido; Sigma) durante 30 min a 37 °C. Después de la excitación a 360 nm, se midió la fluorescencia resultante en 460 nm con un Wallach Victor 2 (Perkin-Elmer, Waltham, MA). Para cada dilución de suero, el porcentaje de transducción se calculó como sigue: (valor experimental - valor de fondo [sin virus]) / (control positivo [sin suero] - valor de fondo) \times 100.

Análisis estadístico

Se llevó a cabo un ensayo de Mann-Whitney, recomendado para grupos de menos de 30 ratones. Las diferencias se consideraron significativas cuando $P < 0,05$.

ResultadosProducción y caracterización de Ad que presentan epítomos derivados de la ovoalbúmina

Para analizar si el sitio de inserción del epítomo puede influir en la eficacia de vacunación de Ad que presentan epítomos en su cápsida, se insertaron genéticamente epítomos derivados de la ovoalbúmina (OVA y 3OVA2) en las proteínas hexón (AdH-OVA y AdH-3OVA2) o de la fibra (AdF-OVA y AdF-3OVA2) de un Ad recombinante con *lacZ*. Todos los Ad con la cápsida modificada se produjeron y se purificaron en títulos comparables al AdTS que presenta una cápsida de tipo silvestre (Tabla 1). Los análisis con SDS-PAGE confirmaron que no había diferencias ni en la

composición ni en la integridad del virus entre el Ad con la cápsida modificada y el AdTS (Fig. 1A). Además, no hubo diferencia alguna en la capacidad del Ad con la cápsida modificada para transducir las células CHO-CAR, una línea celular que sobreexpresa el receptor primario del Ad (Fig. 2).

5 La presencia de la secuencia codificante del epítipo OVA o 3OVA2 en el genoma del Ad se confirmó realizando PCR en viriones purificados (datos no presentados). Para AdF-OVA y AdF-3OVA2, se demostró la presencia del epítipo dentro de la fibra mediante una modificación del patrón de migración de la fibra en SDS-PAGE (Fig. 1A). Usando un anticuerpo policlonal anti-ovoalbúmina, se detectó el epítipo OVA o 3OVA2 mediante un ELISA realizado en viriones purificados nativos (Fig. 1B) o desnaturalizados (Fig. 1C). El epítipo 3OVA2 se detectó en AdH-3OVA2 nativo o desnaturalizado y en AdF-3OVA2. El epítipo OVA se detectó en AdH-OVA nativo o desnaturalizado, pero
10 solamente en AdF-OVA nativo (Fig. 1B).

Respuestas humorales anti-ovoalbúmina desencadenadas mediante una inyección de adenovirus con la cápsida modificada (Ejemplo Comparativo)

Para la evaluar la capacidad del Ad con la cápsida modificada para crear una respuesta humoral anti-ovoalbúmina, se inyectó por vía intraperitoneal en ratones C57B1/6 AdTS o Ad con la cápsida modificada (10^{10} partículas virales (pv)). Se recogieron sueros hasta 68 días después de la inyección (p.i.) y se midieron los títulos de Ab IgG anti-ovoalbúmina. La mayoría de los ratones inyectados con Ad con la cápsida modificada presentaron Ab anti-ovoalbúmina, mientras que los ratones inyectados con AdTS no lo hicieron. La producción de Ab ya se detectó el día 7 p.i., llegó a su punto máximo entre el día 14 y el día 28 p.i. y aún se podía detectar 68 días p.i. en el caso de todos los Ad con la cápsida modificada (Fig. 3). Curiosamente, en todos los puntos temporales, los títulos de Ab anti-ovoalbúmina eran mayores cuando el epítipo (OVA o 3OVA2) se insertaba en la proteína hexón en lugar de en la proteína de la fibra. Por esta razón, los ratones inyectados con AdH-3OVA2 presentaban unos títulos de Ab anti-ovoalbúmina mucho mayores que los ratones inyectados con AdF-3OVA2 en todos los puntos temporales ($p < 0,05$ para todos los parámetros cinéticos, y particularmente, $p < 0,01$ el día 14 y 28). Los títulos anti-ovoalbúmina fueron también mayores el día 14 p.i. en los sueros de ratones inyectados con AdH-OVA en vez de con AdF-OVA (Fig. 3, $p < 0,05$). Un análisis cuidadoso de subisotipos de IgG dejó al descubierto un nivel alto de producción de Ab anti-ovoalbúmina IgG2a e IgG2b, lo que sugiere una desviación hacia Th1 de las respuestas humorales anti-Ad (BENIHOUD y col., J Virol, 72, 9514-25, 1998). Curiosamente, los ratones inyectados con AdH-3OVA2 presentaron unos títulos de subisotipos anti-ovoalbúmina IgG2a e IgG2b significativamente más altos en comparación con los ratones inyectados con AdF-3OVA2 (Fig. 4, $p < 0,01$).

30 Para comparar mejor la eficiencia de la vacunación mediante Ad con el hexón modificado o la fibra modificada, a los ratones se les inyectaron los dos virus, obteniéndose así las mejores respuestas humorales (AdH-3OVA2 o AdF-3OVA2) a la dosis de 10^{10} o 10^9 pv y se midieron los anticuerpos anti-ovoalbúmina el día 14 p.i. Los niveles de anticuerpo anti-ovoalbúmina aumentan con la dosis viral tanto para AdH-3OVA2 como para AdF-3OVA2, sin embargo, cualquiera que sea la dosis examinada los niveles fueron más altos en los ratones inyectados con AdH-3OVA2 que en aquellos con AdF-3OVA2 (Fig. 5). Los títulos anti-ovoalbúmina fueron comparables en ratones tratados con 10^9 pv de AdH-3OVA2 y en ratones tratados con 10^{10} pv de AdF-3OVA2, subrayándose de este modo una eficacia 10 veces mayor de AdH-3OVA2 en comparación con AdF-3OVA2 (Fig. 5).

En conjunto, estos resultados indicaron que después de una inyección de Ad con la cápsida modificada, se obtiene una mejor respuesta humoral cuando el epítipo se inserta en la proteína hexón.

La inmunidad anti-Ad preexistente determina las respuestas humorales anti-ovoalbúmina inducidas por Ad con la cápsida modificada

Para determinar en qué medida se pueden reforzar las respuestas humorales anti-ovoalbúmina, en ratones C57BL/6 se inyectaron por vía intraperitoneal los días 0 y 14 AdTS o diferentes Ad con la cápsida modificada. Los sueros se recogieron el día 14 después de la primera y segunda inyección. En comparación con los ratones que recibieron una administración de virus, los títulos Ab anti-ovoalbúmina presentan un aumento de 11 y 1,5 veces en los ratones inyectados dos veces con AdH-OVA y con AdH-3OVA2, respectivamente (Fig. 6). Por el contrario, después de la segunda inyección, los ratones inyectados con AdF-OVA y con AdF-3OVA2 presentan un aumento de 314 y 110 veces en los títulos de Ab anti-ovoalbúmina, respectivamente, comparados con los que se observaron después de la primera administración viral (Fig. 6). Esta mejor eficacia de los Ad con la fibra modificada se siguió observando después de 4 inyecciones de virus por vía intraperitoneal (Fig. 7) y, sorprendentemente, también se encontró usando otro modo de administración del virus (por vía subcutánea) (Fig. 8). Cabe destacar que este tipo de aumento tan dramático en las respuestas humorales después de la segunda inyección de Ad con la fibra de modificada solamente se observó en Ab anti-ovoalbúmina. De hecho, ni los Ab anti- β -gal ni los anti-Ad aumentaron diferencialmente después de la provocación con Ad con la fibra modificada en comparación con los Ad con el hexón modificado o con AdTS (Fig. 6).

Los resultados destacan que después de la segunda administración del virus, se obtiene una respuesta humoral mucho más poderosa con la inserción del epítipo en la proteína de la fibra, revirtiéndose de este modo la jerarquía observada después de una inyección de virus (Figs. 3 a 5). Debido a que se descartó una diferencia en la cinética de las respuestas de Ab anti-ovoalbúmina entre el Ad con la fibra modificada y el Ad con el hexón modificado (Fig. 3),

se examinó un posible papel de la inmunidad anti-Ad en el control de los niveles de Ab anti-ovoalbúmina. Los ratones se inyectaron con PBS o con AdTS (10^{10} pv) y, dos semanas después, los ratones recibieron una inyección de AdH-3OVA2 o AdF-3OVA2. Los ratones inyectados con AdTS seguido por AdH-3OVA2 presentaron un descenso de 21 veces en los títulos de Ab anti-ovoalbúmina en suero comparados con los ratones inyectados con PBS seguido de AdH-3OVA2 (Fig. 9A), lo que sugiere que la inmunidad a Ad pre-existente amortigua la capacidad del sistema inmunitario para crear una respuesta humoral contra el epítipo de la ovoalbúmina insertado en la proteína hexón. En cambio, los ratones inyectados sucesivamente con AdTS y AdF-3OVA2 presentaron un aumento de 55 veces en los títulos de Ab en suero comparados con los ratones inyectados con PBS y AdF-3OVA2 (Fig. 9A).

Las respuestas anti-Ad humorales pero no las celulares potencian las respuestas humorales anti-ovoalbúmina inducidas por el Ad con la fibra modificada

Para examinar cómo influye la respuesta inmunitaria a Ad en las respuestas humorales anti-ovoalbúmina, se estudiaron los papeles respectivos de linfocitos y anticuerpos anti-Ad. En primer lugar, se analizó la respuesta humoral anti-ovoalbúmina en ratones que en los que se habían transferido adoptivamente esplenocitos ingenuos o anti-Ad antes de administrar Ad con la cápsida modificada. La Fig. 9B indica que en comparación con sus homólogos ingenuos, los esplenocitos de ratones inmunes a Ad redujeron de forma espectacular la respuesta anti-ovoalbúmina en ratones inyectados con AdH-3OVA2, pero potenciaron esta respuesta en los ratones inyectados con AdF-3OVA2 (Fig. 9B). Para definir aún más el papel de la inmunidad celular anti-Ad, los linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ de ratones inyectados con PBS o con AdTS se clasificaron y se transfirieron adoptivamente a receptores ingenuos antes de la administración de AdH-3OVA2 o AdF-3OVA2. Las Fig. 9D y Fig. 9E descartaron una influencia importante de los linfocitos Anti-Ad CD4⁺ o CD8⁺ en la creación de respuestas de Ab anti-ovoalbúmina. Por el contrario, la transferencia de suero de ratones inmunes a Ad a ratones ingenuos antes de la administración de AdH-3OVA2 o AdF-3OVA2 llevó a una fuerte inhibición o a un aumento espectacular de las respuestas de Ab anti-ovoalbúmina, respectivamente.

En conjunto, estos resultados subrayan que la inmunidad humoral anti-Ad preexistente determina claramente la respuesta humoral contra un epítipo derivado de ovoalbúmina insertado en la cápsida de Ad. Sobre todo, los inventores subrayan que, en los ratones inmunes a Ad, la fibra constituye el mejor sitio para la inserción del péptido para crear una respuesta humoral anti-epítipo eficaz.

Enmascaramiento del epítipo derivado de la ovoalbúmina insertado en la proteína hexón mediante anticuerpos anti-Ad

Con el fin de entender cómo los Ab anti-Ad afectan a las respuestas humorales anti-ovoalbúmina, primero se examinó si había diferencia en la sensibilidad de AdH-3OVA2 o AdF-3OVA2 a anticuerpos producidos contra el AdTS. En primer lugar se incubaron AdH-3OVA2, AdF-3OVA2 y AdTS sin ninguna o con diferentes diluciones de suero anti-Ad, después se analizó la capacidad que tenían de transducir células que expresan CAR. Los resultados indicaron, para todos los virus, una inhibición comparable de transducción celular mediante anticuerpos anti-Ad como se documenta midiendo la actividad β -gal (Fig. 10). De este modo, la diferencia en la creación de respuestas de Ab anti-ovoalbúmina entre los Ad con la fibra modificada y con el hexón modificado no estaba asociada con una neutralización diferencial por anticuerpos anti-Ad.

Como una hipótesis alternativa, se propuso que los Ab anti-Ad podían inducir un impedimento estérico e inhibir *in vivo* el reconocimiento del epítipo de la ovoalbúmina mediante linfocitos B, lo que lleva a un descenso de las respuestas humorales anti-ovoalbúmina en ratones inyectados con AdH-3OVA2. Esta hipótesis se apoya en informes previos que muestran que la proteína hexón era la diana principal de los anticuerpos anti-Ad (ROBERTS y col., Nature, 441, 239-43, 2006). Para tener una idea de la accesibilidad del epítipo de la ovoalbúmina, se inmovilizaron Ad con la cápsida modificada en placas de ELISA y se incubaron con suero de ratones ingenuos o inyectados con AdTS, después se detectó el epítipo 3OVA2 por un Ab policlonal anti-ovoalbúmina. La Fig. 11 mostró una inhibición mediada por Ab anti-Ad de la detección del epítipo 3OVA2 tanto en AdH-3OVA2 como en AdF-3OVA2. Sin embargo, debería enfatizarse que la detección del epítipo de la ovoalbúmina se redujo fuertemente a una alta concentración en suero para AdH-3OVA2 en comparación con AdF-3OVA2, sugiriendo esto que los Ab anti-Ad reducían la accesibilidad del epítipo cuando se insertaban en la proteína hexón.

Eficacia de la vacuna de Ad con la fibra modificada o con el hexón modificado en comparación con Ad recombinante que expresa el antígeno de interés

Para comparar la eficacia de la vacuna de la estrategia de presentación de epítipos con el enfoque clásico que se basa en que Ad dirige la expresión del antígeno de interés, se inyectó a los ratones C57BL/6 dos veces Ad con la cápsida modificada (AdH-3OVA2 o AdF-3OVA2) o AdTS-Ovalb, que contiene un cassette de expresión para la proteína ovoalbúmina. Después de la primera inyección, los títulos de Ab anti-ovoalbúmina obtenidos eran más altos para los ratones inyectados con AdTS Ovalb comparados con AdH-3OVA2 o AdF-3OVA2. Sin embargo, después de la segunda administración del virus, se obtuvo una respuesta humoral anti-ovoalbúmina comparable en los ratones inyectados con AdF-3OVA2 o con AdTS Ovalb (Fig. 12), subrayándose de este modo la potencia de la estrategia de vacunación de presentación de epítipos después de dos inyecciones de virus.

Eficacia de la vacuna después de la estimulación inicial con Ad con el hexón modificado y el refuerzo con Ad con la fibra modificada o con Ad con el hexón modificado

5 Los inventores analizaron la respuesta humoral anti-ovoalbúmina inducida mediante una primera administración de AdH-3OVA2 seguida por una segunda administración de AdF-3OVA2, para compararla con las inducidas por dos administraciones consecutivas de AdH-3OVA2 o AdF-3OVA2. La **Figura 13** muestra que los ratones inyectados con AdH-3OVA2 seguido por AdF-3OVA2 presentan, después de la segunda administración, un nivel de respuesta de Ab anti-ovoalbúmina comparable a la de los ratones inyectados dos veces con AdF-3OVA2, y superior a la de los ratones inyectados dos veces con AdH-3OVA2.

Análisis

10 Los resultados indicaron que después de una inyección de Ad, se desencadenaron las respuestas humorales anti-ovoalbúmina más fuertes cuando el epítipo se insertó en la proteína hexón, subrayándose de este modo el importante papel del número de epítopos (240×3 para Ad con el hexón modificado frente a 12×3 para Ad con la fibra modificada). Por el contrario, después de dos o más inyecciones, se obtuvo un aumento considerable en las respuestas humorales anti-ovoalbúmina cuando el epítipo se insertó en la proteína de la fibra. Además, los datos de
15 los presentes inventores aclararon el papel de la inmunidad anti-Ad en el control de las respuestas humorales anti-epítipo.

Para estudiar la influencia del sitio de inserción sobre la inmunogenicidad del epítipo, se insertó OVA₃₂₃₋₃₃₉ (OVA) sola o rodeada por restos que flanquean este epítipo en la proteína ovoalbúmina (3OVA2), en la proteína del hexón o en la proteína de la fibra. Los estudios *in vitro* mostraron que este epítipo se reconocía mejor por Ab anti-ovoalbúmina policlonales en AdH-3OVA2 y en AdF-3OVA2 que en AdH-OVA y en AdF-OVA. Esto sugiere que la accesibilidad o la conformación de OVA₃₂₃₋₃₃₉ se mejora añadiendo restos flanqueantes. Después de la desnaturalización de los viriones, el epítipo OVA₃₂₃₋₃₃₉ se detectó mejor en AdH-3OVA2 frente a AdF-3OVA2 y en AdH-OVA frente a AdF-OVA en correlación estricta con el número de epítopos por cápsida. Sin embargo, los resultados fueron sorprendentemente diferentes para viriones nativos. De hecho, se detecta mejor OVA₃₂₃₋₃₃₉ en
20 AdF-3OVA2 que en AdH-3OVA2, lo que sugiere que la proteína de la fibra que sobresale naturalmente del virión es un sitio más adecuado para presentar un epítipo de linfocitos B.

Después de una inyección de Ad con la cápsida modificada en ratones C57B1/6, se obtuvo una respuesta humoral anti-ovoalbúmina más alta con AdH-OVA y AdH-3OVA2 en comparación con AdF-OVA y AdF-3OVA2. Esta jerarquía entre los Ad modificados en el hexón y la fibra se mantiene durante toda la cinética hasta 68 días p.i. Además, una dosis de 10⁹ pv de AdH-3OVA2 llevó a niveles similares de Ab anti-ovoalbúmina que 10¹⁰ pv de AdF-3OVA2, lo que demuestra una eficacia 10 veces mejor de la vacunación mediante AdH-3OVA2. Estos resultados fueron sorprendentes dada la mejor accesibilidad de OVA₃₂₃₋₃₃₉ en la proteína de la fibra. Sin embargo, podrían estar relacionados con el número de epítopos por cápsida (240×3 frente a 12×3), lo cual sugiere un papel directo del número de epítopos en la eficacia de la vacunación.
30

Después de la segunda inyección se observó un refuerzo de Ab anti-ovoalbúmina en todos los grupos de ratones. Sin embargo, aunque los Ad con el hexón modificado llevaron solamente a un aumento moderado en las respuestas de Ab anti-ovoalbúmina, los Ad con la fibra modificada desencadenaron un aumento espectacular. Como consecuencia, la segunda inyección de Ad con la cápsida modificada revierte la jerarquía que se observa después de una inyección, desencadenando los Ad con la fibra modificada las mayores respuestas de Ab anti-ovoalbúmina.
35 Curiosamente, esta tendencia se mantiene incluso después de hasta 4 inyecciones. La eficacia de refuerzo de las respuestas humorales anti-ovoalbúmina por Ad con la fibra modificada se observó no solamente después de la inyección intraperitoneal de Ad, sino también después de la inyección subcutánea y, por lo tanto, no era dependiente del modo de administración de los viriones. Sorprendentemente, esta eficacia de refuerzo parece ser específica del epítipo que se inserta en la cápsida, ya que no se observó ninguna diferencia en el grado de refuerzo de los Ab anti-βga1 o anti-Ad entre todos los virus. Según el conocimiento de los inventores, éste es el primer informe que muestra una diferencia en la eficacia de la vacunación entre los Ad con la cápsida modificada tras una segunda inyección.
40

El aumento espectacular en las respuestas de Ab anti-ovoalbúmina observadas después de la segunda inyección de Ad con la fibra modificada no pudo explicarse por una cinética diferente a la de los Ad con el hexón modificado. Por lo tanto, los inventores propusieron la hipótesis de que la inmunidad de Ad tiene un papel en la determinación de las respuestas de Ab anti-epítipo. De hecho, los ratones inmunes a Ad inyectados con AdF-3OVA2 presentaron unos niveles de Ab anti-ovoalbúmina mucho mayores que los ratones ingenuos inyectados con AdF-3OVA2. Para identificar qué componente de la inmunidad anti-Ad interviene en la potenciación de las respuestas de Ab anti-ovoalbúmina, en los ratones se inyectaron esplenocitos totales, linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ purificados o suero de ratones inmunes a Ad y después se expusieron a AdF-3OVA2. Las respuestas humorales anti-ovoalbúmina se reforzaron por suero anti-Ad o por esplenocitos, pero no por linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ anti-Ad. De estos resultados se dedujo que los Ab anti-Ad del suero eran responsables de las mayores respuestas humorales anti-epítipo. Por el contrario, se descartó el papel de la inmunidad celular anti-Ad ya que los linfocitos T anti-Ad CD4⁺ o CD8⁺ no modificaban las respuestas humorales anti-epítipo. Cabe destacar que la aparente contradicción con el refuerzo inducido por esplenocitos totales se podría resolver por la presencia dentro de los esplenocitos de células plasmáticas capaces de producir niveles significativos de Ab anti-Ad.
50
55
60

En un marcado contraste con los Ad con la fibra modificada, la reinyección de Ad con el hexón modificado llevó a un refuerzo moderado de la respuesta anti-ovoalbúmina. Además, las respuestas anti-ovoalbúmina que se desencadenaron por los Ad con el hexón modificado fueron reducidas en los ratones inmunes a Ad en comparación con los ratones ingenuos, lo cual sugiere que las respuestas inmunes anti-Ad limitan la eficacia de la vacunación contra el epítipo incluido dentro de la proteína hexón. Esto está de acuerdo con los experimentos de transferencia de suero que muestran niveles reducidos de Ab anti-ovoalbúmina en ratones que reciben suero anti-Ad antes de la inyección de Ad con el hexón modificado. En conjunto, estos resultados demuestran que los Ab anti-Ad reducen la inducción de las respuestas de anticuerpos contra el epítipo de la ovoalbúmina insertado en la proteína hexón. Como se analiza por Getahun y col. para otros antígenos, dos hipótesis, la eliminación de antígenos o el enmascaramiento del epítipo, podrían explicar la reducción mediada por Ab de las respuestas humorales anti-epítipo (GETAHUN & HEYMAN, Scand J Immunol, 70, 277-87, 2009). La primera hipótesis se invalidó ya que no había diferencias en la inducción de anticuerpos anti-Ad y la sensibilidad entre los Ad con la fibra modificada y con el hexón modificado. De este modo, en contraste con los datos anteriores, la eliminación del hexón HVR5 no modifica significativamente la sensibilidad a Ab de Ad (ABE y col., J Gene Med, 11, 570-9, 2009). La segunda hipótesis, el enmascaramiento del epítipo por Ab anti-Ad, se confirma claramente mediante la observación de que la detección del epítipo dentro de la proteína hexón se inhibía en presencia de Ab anti-Ad. Dicha influencia de estos Ab no es sorprendente dado el hecho de que la proteína hexón es la diana principal de los Ab neutralizadores de Ad (SLTMIDA y col., J Immunol, 174, 7179-85, 2005; ROBERTS y col., Nature, 441, 239-43, 2006). Además, como la mayoría de estos Ab están dirigidos contra las HVR del hexón, pueden limitar mediante impedimento estérico el reconocimiento del epítipo por los linfocitos B.

También cabe destacar que después de dos administraciones, se demostró que las respuestas anti-ovoalbúmina desencadenadas por Ad con la fibra modificada eran comparables a las inducidas por un Ad recombinante que expresa la ovoalbúmina como un transgén. Esto es significativo, ya que este último virus codifica la proteína ovoalbúmina completa y no solo el epítipo 3OVA2.

El presente estudio arroja una nueva perspectiva sobre los factores determinantes que controlan la estrategia de vacunación desarrollada recientemente basada en la presentación de epítipos por Ad. De hecho, se esclareció un papel inesperado de Ab anti-Ad en el control de la eficacia de la vacunación contra un epítipo incluido en la cápsida. Dependiendo del sitio de inserción del epítipo, se demostró que los Ab anti-Ad podían aumentar drásticamente (inserción en la fibra) o reducir (inserción en el hexón) la respuesta humoral contra el epítipo. Una novedad importante en los descubrimientos de los presentes inventores es que se ofrecen claves para elegir la mejor vacuna basada en Ad a usar en situaciones clínicas. Por lo tanto, se puede prever que los Ad con el hexón modificado serían más eficaces en el desencadenamiento de una respuesta anti-epítipo en pacientes no expuestos previamente a Ad. Por el contrario, es de esperar una mejor eficacia de Ad que presentan epítipos en la proteína de la fibra en pacientes seropositivos a Ad5 o en caso de inyecciones repetidas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> INSTITUT GUSTAVE ROUSSY BENIHOUD, Karim LANZI, Anastasia PERRICAUDET, Michel

<120> VECTORES DE VACUNA DE ADENOVIRUS

<130> MJP-F1534-11-PCT

<160> 14

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Epítipo de la ovoalbúmina

<400> 1

Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly
 1 5 10 15

Arg

<210> 2

<211> 22

ES 2 463 966 T3

<212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Epítopo de la ovoalbúmina

<400> 2
 Ser Leu Lys Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn
 1 5 10 15

Glu Ala Gly Arg Glu Val 20

10 <210> 3
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Adenovirus

15 <400> 3
 Thr Thr Glu Ala Ala Ala Gly Asn Gly Asp Asn Leu Thr
 1 5 10

20 <210> 4
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Adenovirus

25 <400> 4
 Thr Gln Glu Thr Gly Asp Thr Thr Pro Ser
 1 5 10

30 <210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Cebador

<400> 5
 atgggatgaa gctgctactg 20

40 <210> 6
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Cebador

<400> 6
 ggcatatctc aagctgtcca tgcagcacat gcagaaatca atgaagcagg cagacttggc 60

50 ggccc 65

55 <210> 7
 <211> 68
 <212> ADN
 <213> Artificial

ES 2 463 966 T3

```

<220>
<223> Cebador

<400> 7
5   ttagggccgc caagtctgcc tgettcttg atttctgcat gtgctgcatg gacagcttga      60
    gatatgcc                                     68

<210> 8
<211> 80
10  <212> ADN
    <213> Artificial

<220>
<223> Cebador
15  <400> 8
    ggcagcctga agatatctca agctgtccat gcagcacatg cagaaatcaa tgaagcaggc      60
    agagaggcgc ttggcggccc                                     80

<210> 9
<211> 83
20  <212> ADN
    <213> Artificial

<220>
<223> Cebador
25  <400> 9
    ttagggccgc caagcacctc tctgectgct tcattgattt ctgcatgtgc tgcattggaca      60
    gcttgagata tcttcaggct gcc                                     83

<210> 10
<211> 30
35  <212> ADN
    <213> Artificial

<220>
<223> Cebador

40  <400> 10
    cagctccatc tctaactgt agactaaatg      30

<210> 11
<211> 83
45  <212> ADN
    <213> Artificial

<220>
<223> Cebador
50  <400> 11
    gtaaccctaa ccattacact aaacggttct agcatatctc aagctgtcca tgcagcacat      60
    gcagaaatca atgaagcagg agc                                     83

55  <210> 12

```


ES 2 463 966 T3

```

<211> 88
<212> ADN
<213> Artificial

5   <220>
    <223> Cebador

    <400> 12

        gctagaacct ctgcctgctt cattgatttc tgcattgtgct gcatggacag cttgagatat      60
10   gctagaaccg tttagtgtaa tggttagg                                     88

    <210> 13
    <211> 108
    <212> ADN
    <213> Artificial

15   <220>
    <223> Cebador

20   <400> 13

        gtaaccctaa ccattacact aaacggttct agcagcctga agatatctca agctgtccat      60
        gcagcacatg cagaaatcaa tgaagcaggc agagaggtgg gttctagc                108

25   <210> 14
    <211> 103
    <212> ADN
    <213> Artificial

30   <220>
    <223> Cebador

    <400> 14

        gctagaaccc acctctctgc ctgcttcatt gatttctgca tgtgctgcat ggacagcttg      60
        agatatcttc aggctgctag aaccgtttag tgtaatggtt agg                       103
35

```

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un adenovirus recombinante de replicación defectuosa que tiene uno o más polipéptidos heterólogos que contienen uno o más epítomos diana insertados en su proteína de la fibra, para su uso como una vacuna que genera una respuesta inmunitaria contra dicho epítomo o epítomos diana, **caracterizado porque** dicho adenovirus para dicho uso es para su administración a un sujeto que tiene una inmunidad humoral preexistente contra un adenovirus.
- 10 2. Un adenovirus recombinante de replicación defectuosa que tiene uno o más polipéptidos heterólogos que contienen uno o más epítomos diana insertados en su proteína de la fibra, y opcionalmente uno o más polipéptidos heterólogos que contienen el mismo o los mismos epítomos diana insertados en una proteína de la cápsida distinta de la proteína de la fibra, para su uso como una vacuna que genera una respuesta inmunitaria contra dicho epítomo o epítomos diana, **caracterizado porque** dicho adenovirus para dicho uso es para su administración repetida a un mismo sujeto.

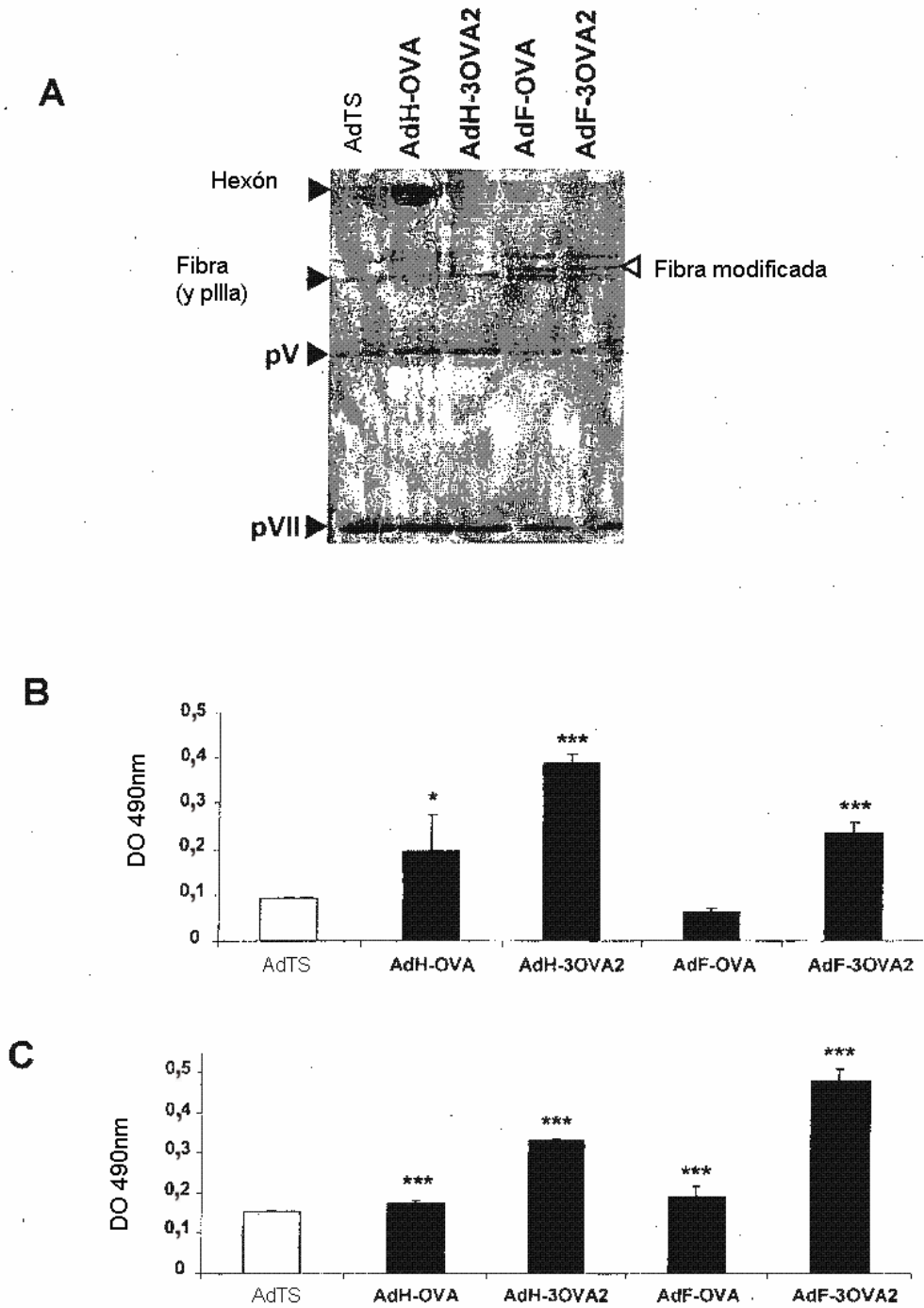


Fig. 1

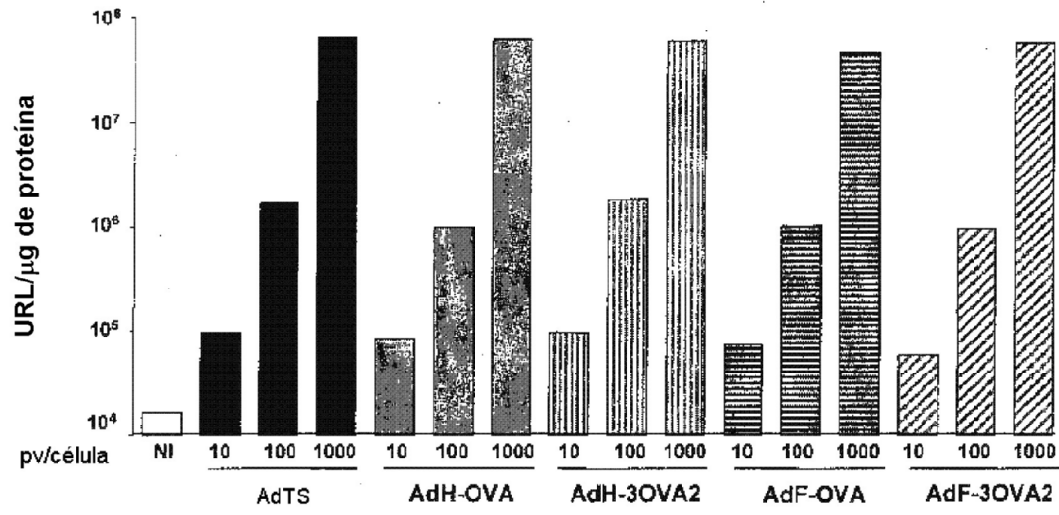


Fig. 2

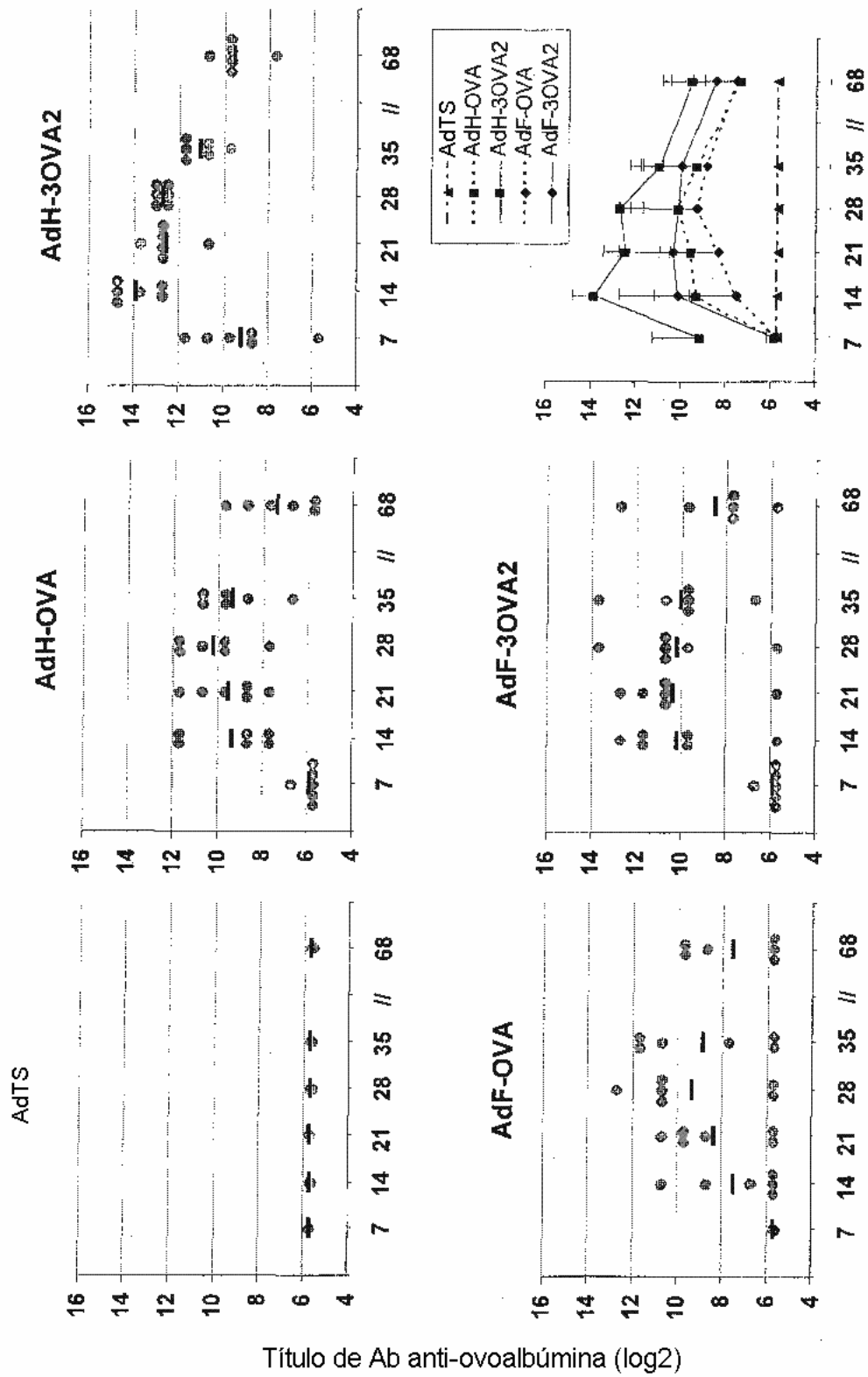


Fig. 3

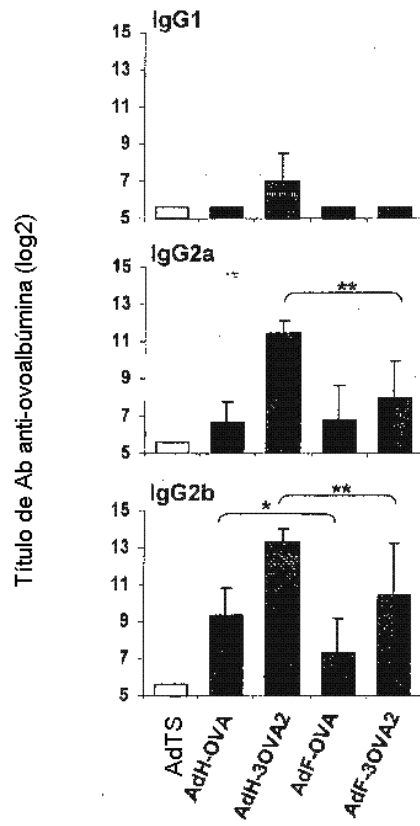


Fig. 4

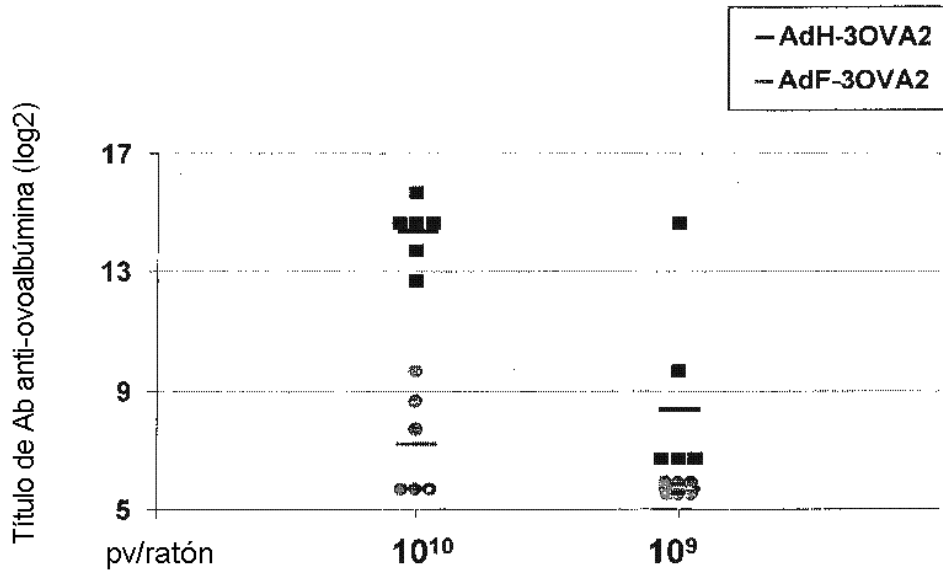


Fig. 5

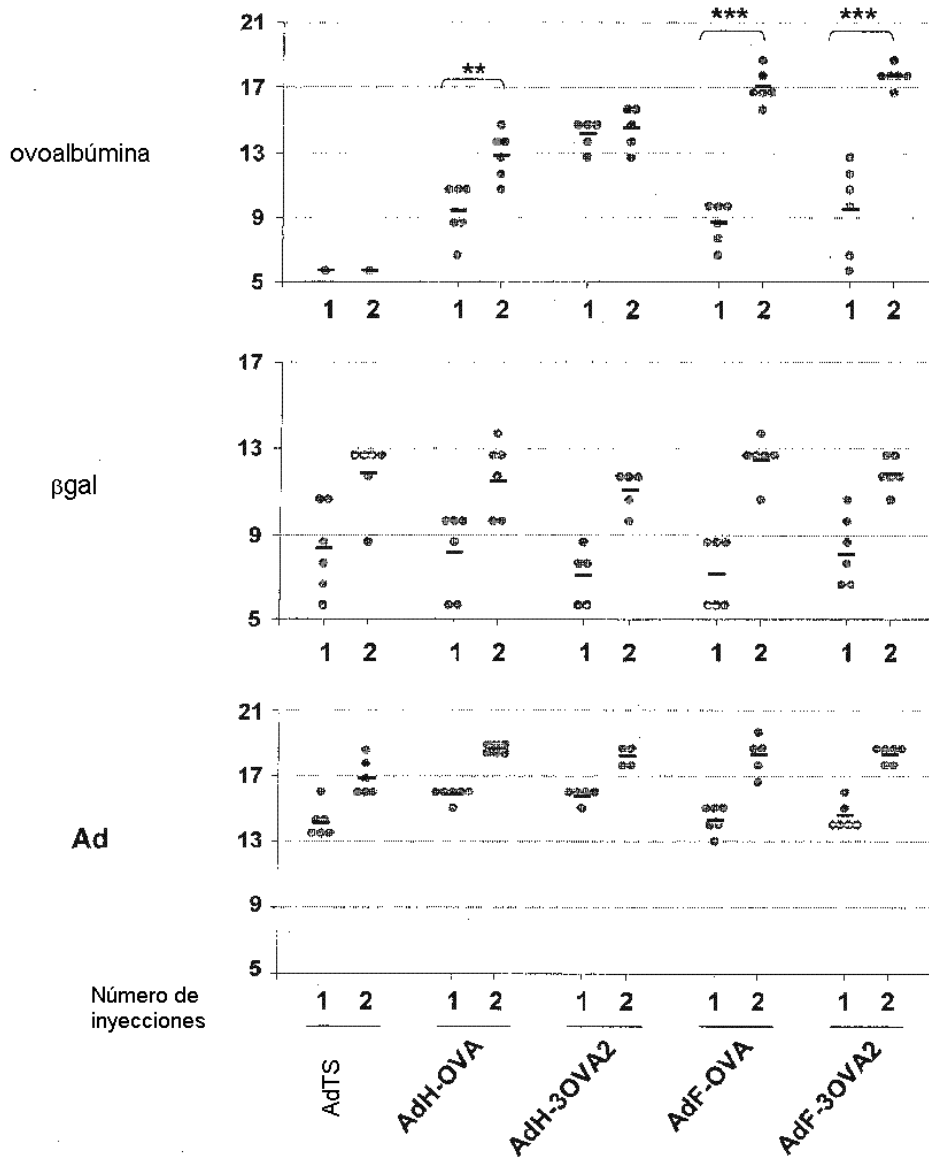


Fig. 6

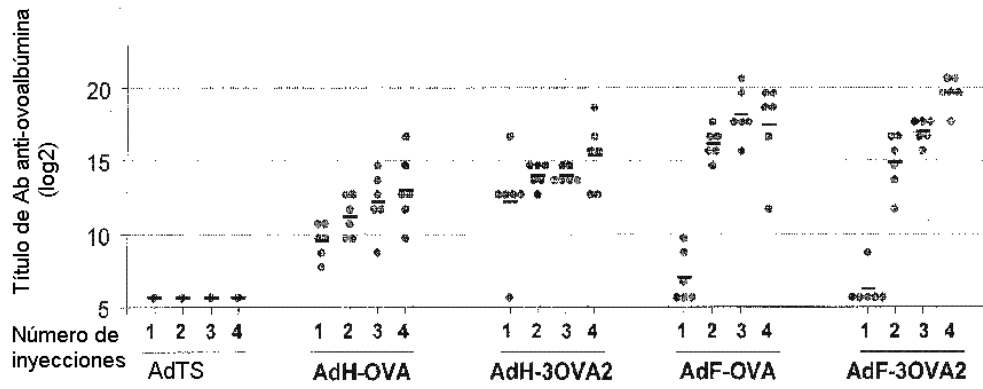


Fig. 7

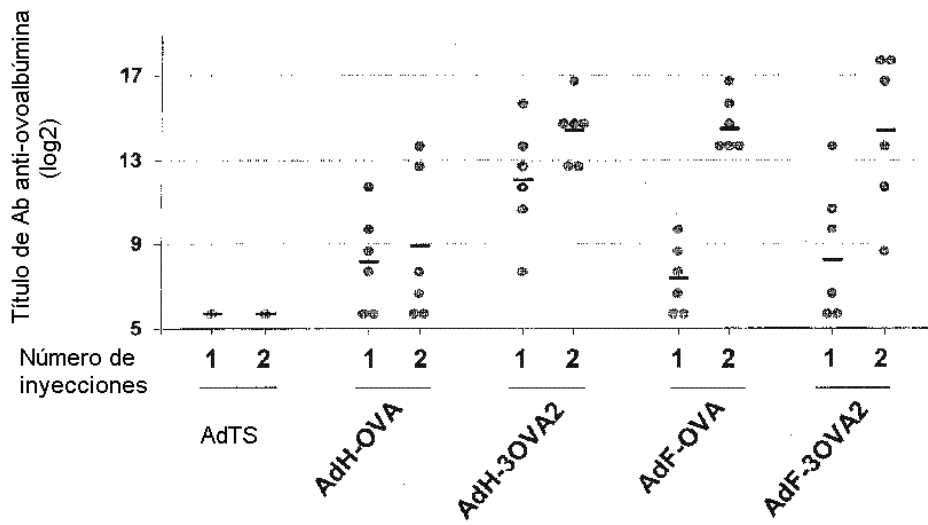


Fig. 8

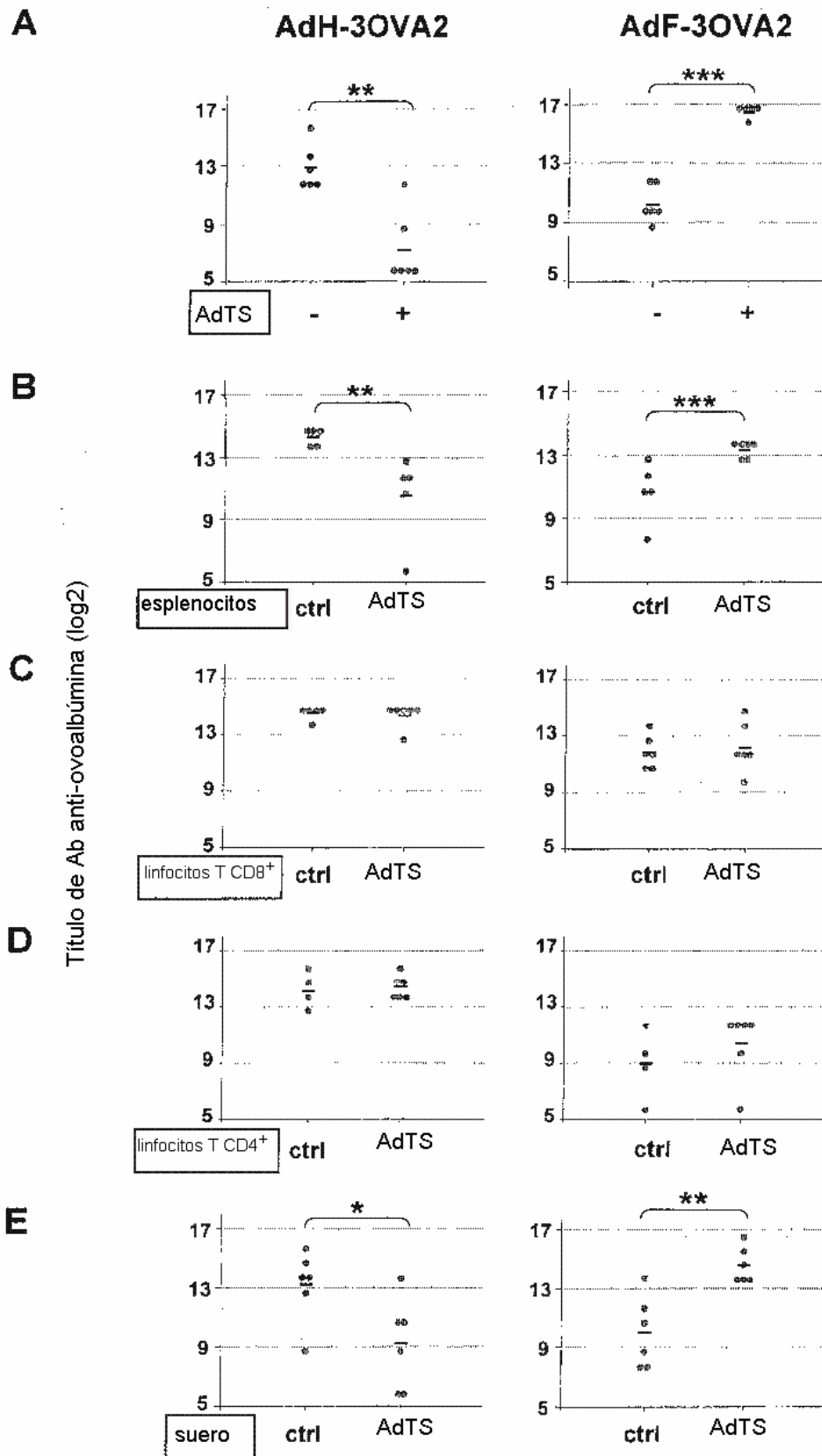


Fig. 9

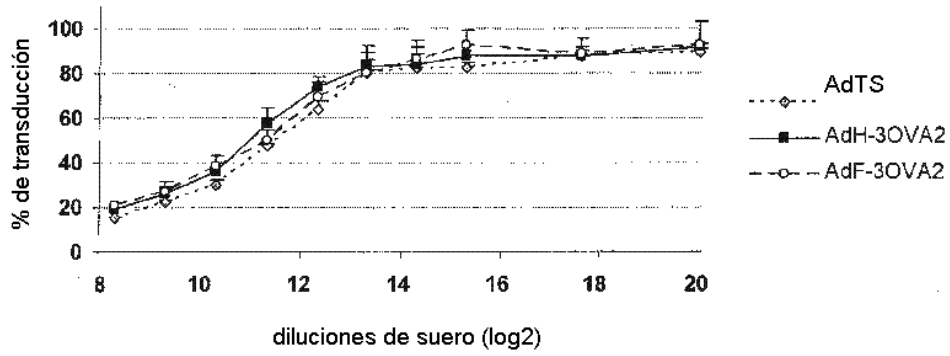


Fig. 10

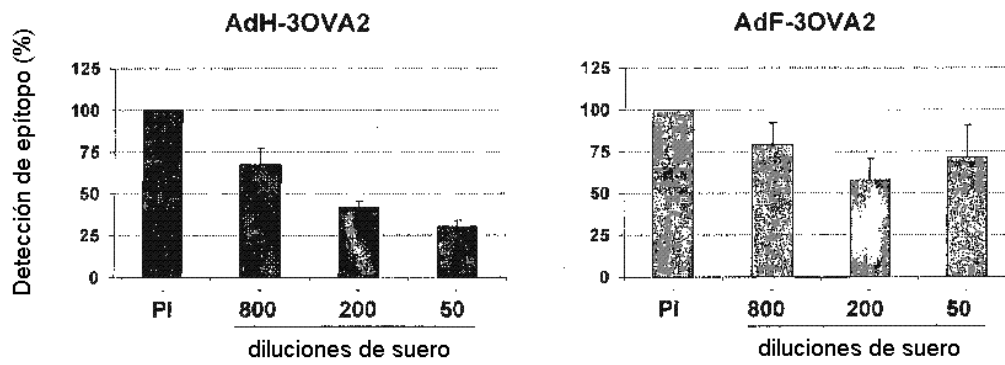


Fig. 11

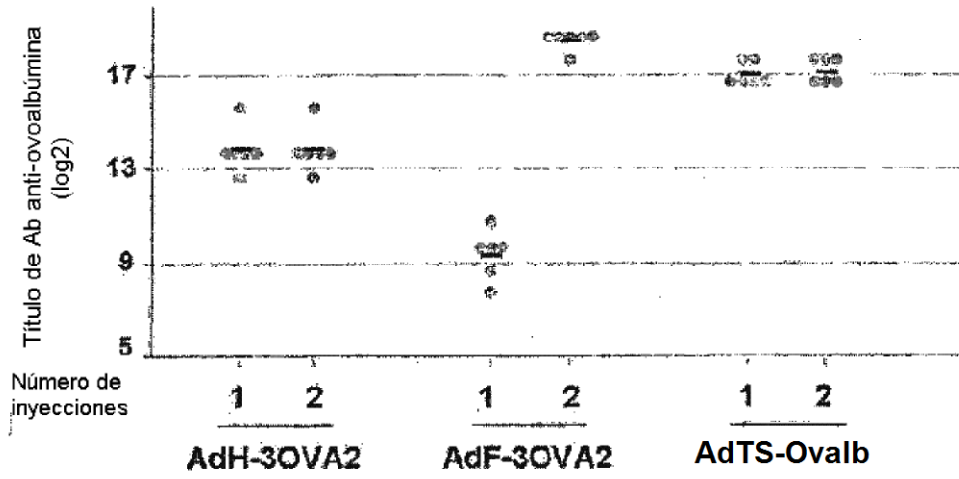


Fig. 12

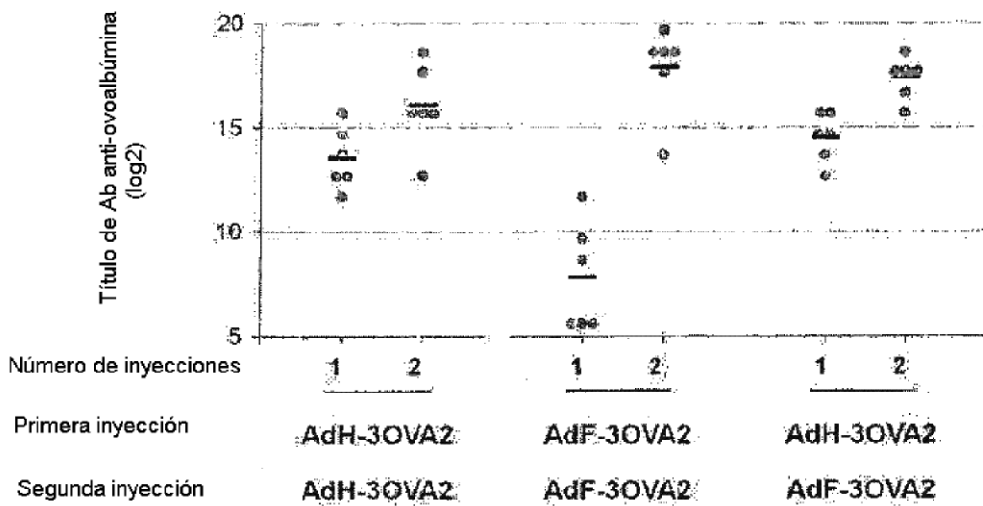


Fig. 13