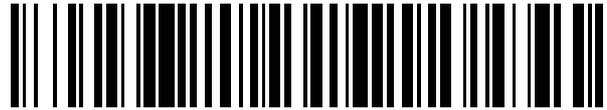


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 156**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/23** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)  
**A61K 39/07** (2006.01)  
**A61K 39/12** (2006.01)  
**A61K 39/145** (2006.01)  
**A61K 39/155** (2006.01)  
**C12N 15/86** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.03.2012 PCT/US2012/029927**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **27.09.2012 WO12129295**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.03.2012 E 12760743 (0)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2017 EP 2688588**

54 Título: **Agente terapéutico inmunológico de acción rápida y prolongada**

30 Prioridad:

**21.03.2011 US 201161454819 P**  
**07.12.2011 US 201161568054 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**04.12.2017**

73 Titular/es:

**ALTIMMUNE INC. (100.0%)**  
**19 Firstfield Road, Ste 200**  
**Gaithersburg, MD 20878, US**

72 Inventor/es:

**TANG, DE-CHU, C.**

74 Agente/Representante:

**VEIGA SERRANO, Mikel**

ES 2 645 156 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

Agente terapéutico inmunológico de acción rápida y prolongada

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere, en general, a los campos de la inmunología y la tecnología terapéutica. La presente invención también se refiere a métodos de generación de respuestas inmunes innatas de acción rápida y prolongada, y a usos de los mismos.

10

**Leyenda federal de financiación**

La presente invención recibió el apoyo, en parte, de las becas de los Institutos Nacionales de la Salud 2-R44-AI-068285-02, 1-UC1-AI-067198-01 y 1-UC1-AI-067205-1; un contrato de los Institutos Nacionales de Salud N01-AI-30063; y un acuerdo de evaluación no clínica del Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas. El gobierno federal puede tener ciertos derechos sobre la presente invención.

15

**Estado de la técnica**

20 El poder de combate contra la enfermedad de los productos inmunológicos (por ejemplo, las vacunas) y terapéuticos (por ejemplo, los fármacos) ha sido una bonanza para la salud pública acreditada con la reducción a nivel mundial de la mortalidad y la morbilidad. El objetivo de amplificar aún más el poder de la intervención médica requiere el desarrollo de una nueva generación de inmunología de respuesta rápida que puede producirse en masa a bajo coste y administrarse en masa por personal no médico; así como una nueva generación de agentes terapéuticos que  
25 pueden conferir protección prolongada, preferentemente no deteriorada por la resistencia a los fármacos. Los nuevos productos inmunológicos y terapéuticos también deben estar dotados de un mayor margen de seguridad que el de las vacunas y los fármacos convencionales.

25

30 El uso de fármacos convencionales contra patógenos microbianos suele inducir la resistencia a los fármacos a lo largo del tiempo debido a que los microbios evolucionan constantemente bajo presión mutacional. La presente invención ilustra que es posible inducir un estado antivírico o antibacteriano rápidamente en animales después de la administración intranasal de una partícula de adenovirus defectuosa en E1/E3 ( $\Delta E1E3$ ) al cambiar el hábitat en la vía respiratoria que impide el crecimiento de patógenos. Dado que la partícula de adenovirus no ataca directamente a un patógeno, hay pocas posibilidades de que este nuevo fármaco induzca resistencia al fármaco. Además, el estado contra los patógenos inducido por adenovirus puede persistir durante muchas semanas en animales, lo suficiente para solaparse con la inducción de inmunidad protectora generada por un antígeno derivado de patógenos expresado a partir del adenovirus, si se inserta un antígeno derivado de patógenos en el genoma adenovírico como una vacuna. Se concibe que una partícula de adenovirus no replicante se pueda administrar junto con otras vacunas mucosas como un adyuvante terapéutico.

35

40 La vacuna no replicante vectorizada con adenovirus promete aumentar la cobertura de la vacuna, porque el vector se puede fabricar rápidamente en células en suspensión sin suero en respuesta a un aumento de la demanda. Además, la inmunidad preexistente hacia el adenovirus no interfiere apreciablemente con la potencia de una vacuna nasal vectorizada con adenovirus. Además de la vacunación humana, los animales también pueden inmunizarse en masa mediante esta clase de vacunas vectorizadas.

45

Hay una letanía de demandas de mejores vacunas. Aunque la vacunación resulta ser el método más rentable para la prevención de enfermedades, una ofensiva radical para aumentar la cobertura de la vacuna sigue siendo un objetivo importante en el movimiento hacia una mejor salud pública en todo el mundo. Las vacunas actuales que han sido autorizadas para su comercialización incluyen microorganismos enteros muertos, microorganismos vivos atenuados, extractos microbianos, proteínas purificadas o recombinantes, vacunas de ADN y partículas similares a los virus. Aunque muchas enfermedades han sido derrotadas por la amplia distribución de estas vacunas, el objetivo de generar inmunidad comunitaria (colectiva) en una amplia variedad de entornos de enfermedades sigue siendo elusivo debido a una serie de problemas en los programas de vacunación actuales.

50

55 En concreto, los efectos secundarios adversos asociados con las vacunas varían desde la respuesta inflamatoria local y sistémica, la fiebre, la activación plaquetaria, la disfunción autónoma cardíaca, la reacción anafiláctica (inducida por la inyección con aguja de ciertas vacunas) [Salomon M. E., Halperin R., Yee J. "Evaluation of the two-needle strategy for reducing reactions to DPT vaccination". *Am. J. Dis. Child.* 141, 796-798 (1987), Lanza G. A., Barone L., Scalone G. *et al.* "Inflammation-related effects of adjuvant influenza A vaccination on platelet activation and cardiac autonomic function". *J. Intern. Med.* 269, 118-125 (2011), Jae S. Y., Heffernan K. S., Park S. H. *et al.* "Does an acute inflammatory response temporarily attenuate parasympathetic reactivation?" *Clin. Auton. Res.* 20, 229-233 (2010) y Sever J. L., Brenner A. I., Gale A. D. *et al.* "Safety of anthrax vaccine: an expanded review and evaluation of adverse events reported to the Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS)". *Pharmacoepidemiol. Drug Saf.* 13, 825-840 (2004)] a la rara aparición de poliomielitis paralítica (mediada por la ingestión de la vacuna antipoliomielítica oral) [Minor P. "Vaccine-derived poliovirus (VDPV): impact on poliomyelitis

60

65

eradication". *Vaccine* 27, 2649-2652 (2009)]; miopericarditis (inducida por la inoculación de la vacuna Dryvax contra la viruela) [Poland G. A., Grabenstein J. D., Neff J. M. "The US smallpox vaccination program: a review of a large modern era smallpox vaccination implementation program". *Vaccine* 23, 2078-2081 (2005)] y la parálisis de Bell (inducida por un adyuvante nasal de toxina bacteriana) [Lewis D. J., Huo Z., Barnett S. *et al.* "Transient facial nerve paralysis (Bell's palsy) following intranasal delivery of a genetically detoxified mutant of *Escherichia coli* heat labile toxin". *PLoS ONE* 4, e6999 (2009) y Couch R. B. "Nasal vaccination, *Escherichia coli* enterotoxin, and Bell's palsy". *N. Engl. J. Med.* 350, 860-861 (2004)].

En 2010, se notificó un aumento repentino de la narcolepsia entre los vacunados en algunos países tras la inyección con aguja de una vacuna contra la gripe pandémica H1N1 que contenía adyuvante de escualeno. La inyección de escualeno solo puede inducir artritis reumatoide en animales [Carlson B. C., Jansson A. M., Larsson A., Bucht A., Lorentzen J. C. "The endogenous adjuvant squalene can induce a chronic T-cell-mediated arthritis in rats". *Am. J. Pathol.* 156, 2057-2065 (2000)]. A medida que la evidencia emergente muestra que la inflamación crónica de bajo grado se asocia con enfermedades cardiovasculares [Finch C. E., Crimmins E. M. "Inflammatory exposure and historical changes in human life-spans". *Science* 305, 1736-1739 (2004)], obesidad [Gregor M. F., Hotamisligil G. S., "Inflammatory mechanisms in obesity". *Annu. Rev. Immunol.* 29, 415-445 (2011)], diabetes [Gregor M. F., Hotamisligil G. S. "Inflammatory mechanisms in obesity". *Annu. Rev. Immunol.* 29, 415-445 (2011)], cáncer [O'Callaghan D. S., O'Donnell D., O'Connell F., O'Byrne K. J. "The role of inflammation in the pathogenesis of non-small cell lung cancer". *J. Thorac. Oncol.* 5, 2024-2036 (2010)] y el trastorno neurológico [Witte M. E., Geurts J. J., de Vries H. E., van der Valk P., van Horssen J. "Mitochondrial dysfunction: a potential link between neuroinflammation and neurodegeneration?" *Mitochondrion* 10, 411-418 (2010)], la inflamación inducida por la vacuna ahora necesita ser el foco de atención.

Si una reacción inflamatoria aguda inducida por la inyección de un complejo de adyuvante-vacuna inmunoestimulante [Salomon M. E., Halperin R., Yee J., "Evaluation of the two-needle strategy for reducing reactions to DPT vaccination". *Am. J. Dis. Child.* 141, 796-798 (1987), Lanza G. A., Barone L., Scalone G. *et al.* "Inflammation-related effects of adjuvant influenza A vaccination on platelet activation and cardiac autonomic function". *J. Intern. Med.* 269, 118-125 (2011) y Jae S. Y., Heffernan K. S., Park S. H. *et al.* "Does an acute inflammatory response temporarily attenuate parasympathetic reactivation?" *Clin. Auton. Res.* 20, 229-233 (2010)] podría convertirse en una inflamación crónica de bajo grado y desencadenar cualquiera de estas dolencias en un subconjunto de vacunados a lo largo del tiempo es de suma importancia en la sanidad pública; sin embargo, este riesgo potencial no ha sido investigado con rigor. Dado que el concepto de seguridad de las vacunas está evolucionando desde la "protección contra enfermedades inducidas por patógenos" a "ninguna posibilidad de inducir consecuencias adversas", no se permitiría ningún agente foráneo conocido, toxicidad ni virulencia residual en una vacuna, y se deben evitar cualquier posibilidad de inducción de efectos secundarios desconocidos (por ejemplo, inflamación en órganos vitales).

Las respuestas inmunes mucosas y sistémicas son provocadas y reguladas con un considerable grado de independencia, y la mayoría de las vacunas se han administrado de manera invasiva mediante inyección intramuscular, lo que induce una buena inmunidad sistémica, pero a menudo una inmunidad mucosa débil que es crucial para la defensa contra los patógenos de la mucosa (por ejemplo, Virus de la gripe, *Mycobacterium tuberculosis* y VIH) [Gallichan W. S., Rosenthal K. L., "Long-lived cytotoxic T lymphocyte memory in mucosal tissues after mucosal but not systemic immunization". *J. Exp. Med.* 184, 1879-1890 (1996) y Saurer L., McCullough K. C., Summerfield A. "In vitro induction of mucosa-type dendritic cells by all-trans retinoic acid". *J. Immunol.* 179, 3504-3514 (2007)]. La inducción eficiente de la inmunidad mucosa suele emplear la vacunación nasal u oral debido a la capacidad única de las células dendríticas (DC) de la mucosa residentes para inducir el cambio de IgA y para imprimir receptores de asentamiento específico de la mucosa (por ejemplo, CCR9 e integrina 4β7) en linfocitos [Saurer L., McCullough K. C., Summerfield A. "In vitro induction of mucosa-type dendritic cells by all-trans retinoic acid". *J. Immunol.* 179,3504-3514 (2007) y Molenaar R., Greuter M., van der Marel A. P. *et al.* "Lymph node stromal cells support dendritic cell-induced gut-homing of T cells". *J. Immunol.* 183, 6395-6402 (2009)].

Además de la débil inmunidad de la mucosa inducida por una vacuna inyectable, la aguja de la jeringa como un dispositivo de administración de vacunas también plantea problemas graves a través de la reutilización en condiciones no estériles intencionada o no intencionadamente, lesiones por pinchazos de aguja, eliminación inadecuada de desechos, así como un servicio limitado de inyección por el personal médico autorizado durante una crisis [Tang D. C., Van Kampen K. R. "Toward the development of vectored vaccines in compliance with evolutionary medicine". *Expert Rev. Vaccines* 7(4), 399-402 (2008)]. El temor generalizado a las agujas (aicmofobia) desempeña otro papel en la obstaculización de la cobertura de las vacunas. Por lo tanto, algunas personas prefieren arriesgarse a contraer una enfermedad frente a las probabilidades de padecer dolor, lesiones o muerte por vacunación sistémica. Dado que el objetivo de los programas de vacunación es reducir la probabilidad general de infección mediante la generación de inmunidad comunitaria (colectiva), la misión se verá perjudicada por una suspensión de la vacunación debido al miedo generalizado a los riesgos. Hasta la fecha, están surgiendo en el horizonte tecnologías que permiten revertir las percepciones negativas mediante el desarrollo de una nueva generación de vacunas de respuesta rápida que sean seguras, eficaces, indoloras y económicas.

La cita o identificación de cualquier documento en la presente solicitud no es una admisión de que dicho documento está disponible como estado de la técnica en la presente invención.

**Objeto de la invención**

La presente invención se basa en el hallazgo fortuito del inventor de que una partícula vacía de adenovirus  $\Delta E1E3$  libre de transgenes o un vector de adenovirus que codifica un antígeno derivado de patógenos podría generar una respuesta de protección rápida y prologada contra patógenos en una variedad de enfermedades cuando se administra por vía intranasal.

Sin estar limitado por limitación alguna, el solicitante formula la hipótesis de que el adenovirus puede participar en la activación de armas específicas de inmunidad innata que impidan el crecimiento de patógenos de la mucosa respiratoria.

La presente invención se refiere a un método de inducción de una respuesta en un paciente que lo necesite, que puede comprender administrar al paciente un adenovirus defectuoso o eliminado en sus regiones E1 y/o E3 en una cantidad eficaz para inducir la respuesta. En una realización ventajosa, el paciente puede ser un mamífero.

En una realización, el adenovirus no contiene ni expresa un transgén.

En otra realización, el adenovirus puede contener y expresar una molécula de ácido nucleico que codifique un producto génico. En particular, el adenovirus puede comprender una molécula de ácido nucleico exógena o heteróloga que codifique un producto génico derivado de patógenos que genere inmunidad protectora. La molécula de ácido nucleico exógena o heteróloga puede codificar un epítipo de interés. En particular, la molécula de ácido nucleico exógena o heteróloga puede codificar uno o más virus de la gripe; virus respiratorio sincitial (RSV); *Bacillus Anthracis*; u otros epítopos derivados de patógenos de interés y/o uno o más antígenos de la gripe.

En una realización ventajosa, el adenovirus puede ser un adenovirus humano. En otra realización, la respuesta inmune se puede provocar en el plazo de 24 horas. En otra realización, la administración da lugar a una respuesta de protección de aproximadamente un día a aproximadamente 47 días.

Por consiguiente, es un objeto de la invención no incluir dentro de la invención ningún producto previamente conocido, proceso de fabricación del producto ni método de uso del producto, de modo que los solicitantes se reserven el derecho y desvelen mediante el presente documento una exención de responsabilidad de cualquier producto, proceso o método previamente conocido. Se observa además que la invención no pretende englobar en el alcance de la invención ningún producto, proceso o fabricación del producto o método de uso del producto que no cumpla con la descripción escrita y los requisitos de habilitación de la USPTO (35 U.S.C. § 112, primer párrafo) o la EPO (Artículo 83 del EPC), de manera que los solicitantes se reservan el derecho y desvelen mediante el presente documento una exención de responsabilidad de cualquier producto descrito anteriormente, proceso de fabricación del producto o método de uso del producto.

Se observa que, en la presente divulgación, y, en particular, en las reivindicaciones y/o en los párrafos, los términos y las expresiones tales como "comprende", "compuesto", "que comprende" y similares pueden tener el significado atribuido en la legislación de patentes estadounidense; por ejemplo, pueden significar "incluye", "incluye", "incluido", y similares; y que los términos y las expresiones tales como "que consiste esencialmente en" y "consiste esencialmente en" tienen el significado atribuido en la ley de patentes estadounidense, por ejemplo, permiten elementos que no se citan explícitamente, sino que excluyen elementos que se encuentran en la técnica anterior o que afectan a una característica básica o nueva de la invención.

Estas y otras realizaciones se desvelan o son evidentes a partir de y se incluyen en la siguiente descripción detallada.

**Descripción de las figuras**

La siguiente descripción detallada, dada a modo de ejemplo, pero no destinada a limitar la invención únicamente a las realizaciones específicas descritas, se puede entender mejor junto con los dibujos adjuntos.

La FIG. 1 muestra la protección rápida de los ratones frente a las exposiciones al virus de la gripe mediante la administración intranasal de partículas de adenovirus.

La FIG. 2 muestra la protección rápida de los ratones frente al carbunco mediante la administración intranasal de partículas de adenovirus. Las FIG. 3A y 3B representan una terapia profiláctica contra la exposición letal mediante A/PR/8/34 (PR8) en ratones. La terapia profiláctica se realizó mediante administración i.n. de partículas de Ad5 poco antes de la exposición a PR8. AdE/in/-2 y AdE\*/in/-2, administración i.n. de AdE el día -2; AdE/in/+1, administración i.n. de AdE 1 día después de la exposición a PR8; AdE/im/-2, inyección i.m. de AdE en el día -2; AdNC/in/-2 y AdNC\*/in/-2, administración i.n. de AdNC.H1.1 en el día -2; AdNC/im/-2, inyección i.m. de AdNC.H1.1 en el día -2; control no tratado, ratones Balb/c sin tratamiento previo al exposición con PR8; todos los grupos se inocularon con AdE o AdNC.H1.1 a una dosis de  $1,7 \times 10^6$  uif, excepto los grupos AdE\*/in/-2 y AdNC\*/in/-2, que recibieron una dosis de  $1,7 \times 10^6$  uif; todos los grupos se expusieron a la instilación i.n. de  $4 \times DL_{50}$  de PR8 el día 0; los pesos corporales se registraron diariamente durante los 18 días posteriores a la

exposición con una pérdida de peso corporal del 30 % tomada como punto final de la enfermedad; los números entre paréntesis representan la cantidad de animales de cada grupo.

Las FIG. 4A y 4B representan la protección de los ratones mediante el tratamiento profiláctico mediado por Ad5 y la vacunación frente a una dosis superior de exposición a PR8. AdNC/in/-47, administración i.n. de AdNC.H1.1 en el día -47; AdE/in/-47, administración i.n. de AdE en el día -47; AdE/in/-47-2, administración i.n. de AdE en el día -47 seguida de la aplicación de refuerzo del día -2; AdE/in/-1, administración i.n. de AdE en el día -1; wtAd/in/-1, administración i.n. de las partículas de Ad5 de tipo silvestre E1+/E3+ del día -1; todos los grupos recibieron la inoculación de partículas de Ad5 a una dosis de  $1,2 \times 10^8$  uif seguida de la exposición a  $10 \times DL_{50}$  de PR8 en el día 0; los pesos corporales se registraron diariamente durante los 14 días posteriores a la exposición; otros símbolos y protocolos son iguales a los descritos en la leyenda de la FIG. 3.

La FIG. 5 muestra el estado de salud de los animales expuestos a PR8 como se muestra en la pérdida de peso corporal. Los pesos corporales posteriores a la exposición se presentan como un % de peso corporal medio al tomar el peso corporal de los ratones individuales del día 1 como el 100 %. Los símbolos y los protocolos de exposición son los mismos que los descritos en las leyendas de las FIG. 3 y 4. Aunque los animales AdE/in/-47-2 y AdNC/in/-47 perdieron menos peso que los ratones de otros grupos, la diferencia no alcanzó significación estadística (mediante el ANOVA de una vía con los post-tests de comparación múltiple de Turkey, el grupo de control no tratado se excluyó del análisis estadístico debido a la terminación anticipada de los puntos de datos).

Las FIG. 6A-H representan la histopatología pulmonar inducida por la infección por PR8. (A y E) Pulmón extirpado de un ratón de control no tratado (FIG. 3) 19 días después de la exposición a PR8. (B y F) Pulmón extirpado de un ratón Balb/c normal como control. (C y G) Pulmón extirpado de un ratón AdE/in/-2 (FIG. 3) 19 días después de la exposición a PR8; cada sección representa tres ratones. (D y H) Pulmón extirpado de un ratón AdNC/in/-2 (FIG. 3) 19 días después de la exposición a PR8; cada sección representa tres ratones. Las secciones de pulmón se examinaron en un microscopio Zeiss Axioskop2 plus usando una lente de objetivo x2 (A-D) o x10 (E-H) junto con una cámara digital Axiocam.

La FIG. 7 representa los títulos de PR8 en los pulmones después de la exposición. Se instilaron partículas de AdE ( $1,2 \times 10^8$  uif por 50 ml) i.n. en ratones en el día -2, seguido de un control de exposición, y los ratones expuestos a AdE con  $4,6 \times 10^6$  ufp de PR8 el día 0. El Día 5, los títulos de PR8 en los pulmones extirpados de los ratones de control 5 días tras la exposición a PR8; AdE-Día 5, títulos de PR8 en los pulmones extirpados de ratones expuestos a AdE 5 días después de la exposición de PR8; Día 7, títulos de PR8 en los pulmones extirpados de los ratones de control 7 días después de la exposición a PR8; AdE-Día 7, títulos de PR8 en pulmones extirpados de ratones expuestos a AdE 7 días después de la exposición a PR8; triángulo y círculo,  $\log_2(\text{pfu de PR8})/\text{g de pulmón}$  en ratones individuales; barra, media geométrica de los títulos de PR8 en pulmones. No se detectaron títulos de PR8 en los pulmones extirpados de ratones de control que no fueron expuestos a PR8. La diferencia entre el Día 7 y AdE-Día 7 alcanzó significación estadística (mediante el ANOVA de una vía con los post-tests de comparación múltiple de Turkey).

La FIG. 8 representa la protección contra la exposición letal por el CA04 pandémico en ratones. Se instilaron partículas de AdE o AdNC.H1.1 ( $2,5 \times 10^8$  uif por 50  $\mu\text{l}$ ) i.n. en ratones en diferentes puntos temporales, seguido de la exposición a CA04. AdE/in/-22, administración i.n. de AdE en el día -22; AdNC/in/-22, administración i.n. de AdNC.H1.1 en el día -22; control de placebo, administración i.n. de 50  $\mu\text{l}$  de solución salina en el día -22; se expusieron los animales a la instilación i.n. de  $3 \times DL_{50}$  del CA04 pandémico el día 0; otros símbolos y protocolos son los mismos que los descritos en la leyenda de la FIG. 3.

La FIG. 9 representa la arquitectura del adenovirus. (A) Estructura de una partícula de Ad. Ad es un virus de ADN icosaédrico sin envoltura. Su genoma de ADN estrechamente enrollado está empaquetado dentro de una cápside de proteína hexagonal. (B) Disposición del vector de Ad5  $\Delta E1E3$ . El vector de Ad5  $\Delta E1E3$  ha sido ampliamente usado en una gran cantidad de terapias génica, así como en ensayos de vacunas. Su alta inmunogenicidad se consideró un obstáculo para la readministración; sin embargo, el problema se ha visto disminuido por la evidencia reciente que muestra que las vacunas nasales vectorizadas con Ad5  $\Delta E1E3$  pueden eludir la inmunidad hacia el Ad5 preexistente. Ad: Adenovirus; LITR: repetición terminal invertida izquierda; Promotor: un promotor común para impulsar la expresión de transgenes es el promotor temprano de citomegalovirus; PolyA+: un sitio de poliadenilación común es la señal de poliadenilación de SV40; RITR: repetición terminal invertida derecha.

La FIG. 10 representa un cuadro genealógico de vectores de adenovirus no replicantes obtenidos mediante bioingeniería. El Ad tanto humano como animal se ha obtenido mediante bioingeniería en una amplia variedad de vectores de Ad no replicantes para la administración de genes exógenos a sujetos animales y humanos. Ad: Adenovirus.

La FIG. 11 representa un proceso de fabricación para generar una vacuna vectorizada con adenovirus.

La FIG. 12 representa la protección completa conferida por la administración intranasal de un dúo de fármaco-vacuna vectorizado con Ad5. Recientemente, se demostró que la instilación intranasal de AdE (una partícula de  $\Delta E1E3$  Ad5 vacía sin transgén) o AdNC.H1.1 (un vector  $\Delta E1E3$  Ad5 codificante del dominio A/Nueva Caledonia/20/99 HA1) puede conferir protección casi inmediata a los ratones contra la exposición al virus vivo de la gripe [Zhang *et al.* *PLoS ONE* 6, e22605 (2011)]. El tratamiento profiláctico inducido por AdE perduró en ratones durante al menos 22 días, con una disminución parcial de la potencia observada 47 días después de la administración de AdE. La protección inducida por AdNC.H1.1 fue sólida después de 47 días. Línea continua: marco de tiempo de protección sólida; línea discontinua: marco temporal de protección parcial. Como la protección completa inducida por AdE se observó durante 22 días, mientras que la protección parcial se observó 47 días después de la administración, se supuso que los efectos farmacológicos de DVD comenzaron a disminuir

después de 22 días, como se muestra mediante la línea discontinua siguiendo la línea continua. Se informó que una vacuna vectorizada con Ad5 puede generar inmunidad protectora tan pronto como 2 semanas después de la inmunización [Boyer *et al. Hum. Gene Ther.* 16, 157-168 (2005)] como se muestra mediante una línea continua que comienza el día 14 para los efectos de la vacuna del DVD cuando se inocularon partículas de Ad5 el día 0.

Los resultados muestran que la protección completa contra la gripe puede lograrse en ratones mediante la administración intranasal de un DVD vectorizado con Ad5, ya que la vacuna puede provocar inmunidad protectora antes de que disminuyan los efectos del fármaco. Ad: Adenovirus; DVD: dúo de fármaco-vacuna.

La FIG. 13 representa ratones protegidos con vacuna nasal vectorizada con Ad5 contra el virus de la gripe aviar A/VN/1203/04 (H5N1). Los ratones se inmunizaron i.n. en el día 0 y se expusieron a A/VN/1203/04 (H5N1) a una dosis de  $10 \times DL_{50}$  para ratones ( $10^{4.4}$  DIE<sub>50</sub>) en SRI el Día 63. HA, Ad que codifica HA1 + HA2; HA1, Ad que codifica HA1; E7,  $10^7$  pv; E<sup>10</sup>,  $10^{10}$  pv; HI, GMT de títulos de HI en suero el Día 49.

La FIG. 14 representa hurones protegidos con vacuna nasal vectorizada con Ad5 contra el virus de la gripe aviar A/VN/1203/04 (H5N1). Los hurones se inmunizaron i.n. en el día 0 y se expusieron a A/VN/1203/04 a una dosis de  $10 \times DL_{50}$  para hurones ( $10^2$  DIE<sub>50</sub>) en SRI el Día 56. HA, Ad que codifica HA1+HA2; HA1; E10,  $10^{10}$  pv; HI, GMT de los títulos de HI en suero el Día 51.

La FIG. 15 representa el tratamiento profiláctico del carbunco mediante la instilación intranasal de partículas de adenovirus poco antes de la exposición a esporas con  $1 \times 10^5$  ufc ( $\sim 25 \times DL_{50}$ ) de esporas de Sterne de *Bacillus anthracis*. AdVAV/-2, partículas de AdVAV instiladas i.n. 2 días antes de la exposición a una dosis de  $1,3 \times 10^8$  uif; AdE/-2, partículas de AdE instiladas i.n. 2 días antes de la exposición a una dosis de  $1,3 \times 10^8$  uif; AdE<sup>+</sup>/-2, partículas de AdE instiladas i.n. 2 días antes de la exposición a una dosis de  $1,3 \times 10^6$  uif (dilución con factor de dilución de 100 en PBS); AdE/-1, partículas de AdE instiladas i.n. 1 día antes de la exposición a una dosis de  $1,3 \times 10^8$  uif; Control, ratones de control sin tratar; los números entre paréntesis representan el número de animales de cada grupo.

La FIG. 16 representa el tratamiento del carbunco posterior a la exposición mediante la instilación i.n. de partículas de AdVAV. AdVAV/D-2, partículas de AdVAV instiladas i.n. 2 días antes de la exposición a una dosis de  $1,33 \times 10^8$  uif; AdVAV/D0, partículas de AdVAV instiladas i.n. una hora después de la exposición a una dosis de  $1,33 \times 10^8$  uif; AdVAV/Cipro/D0, partículas de AdVAV instiladas i.n. 1 hora después de la exposición a una dosis de  $1,33 \times 10^8$  uif en combinación con inyección i.p. de ciprofloxacina; Cipro/D0, inyección i.p. de ciprofloxacina; Control, ratones de control no tratados sin tratamientos antes de la exposición; los números entre paréntesis representan el número de animales de cada grupo.

La FIG. 17 (no mostrada) representa el efecto de AdE administrado por vía intranasal en el lavado nasal de RSV-Tracy, así como los títulos de virus del lavado pulmonar en el Día +4. Grupo 1: 6 RC tratados profilácticamente (día -2) por vía intranasal con vehículo (tampón A195); Grupo 2: 6 RC tratados profilácticamente (día -30) por vía intranasal con  $2,4 \times 10^8$  uif de AdE; Grupo 3: 6 RC tratados profilácticamente (día -2) por vía intranasal con  $2,4 \times 10^8$  uif de AdE; Grupo 4: 6 RC tratados profilácticamente (días -30 y -2) por vía intranasal con  $2,4 \times 10^8$  uif de AdE durante cada ciclo de tratamiento (sensibilización/refuerzo); y Grupo 5: 6 RC tratados profilácticamente (-5 h) por vía intranasal con  $2,4 \times 10^8$  uif de AdE.

## Descripción detallada de la invención

La invención se basa, en parte, en el hallazgo del inventor de que tan rápido como un día después de la administración de un vector Ad vacío (E1/E3 eliminado sin inserción), los ratones se protegen contra una gripe. En la actualidad, se desconoce el mecanismo para esta protección, pero es una protección muy amplia. Los ratones se protegieron de una exposición a la gripe estacional, exposición a la gripe porcina, exposición a la gripe aviar, exposición al RSV e incluso exposición al carbunco. Esta protección dura desde aproximadamente un día hasta aproximadamente 47 días. Los controles de Ad de tipo silvestre no proporcionaron ninguna protección y las vacunas administradas por vía intramuscular no proporcionaron ninguna protección. La protección se produjo incluso cuando se insertó un gen en la región de E1, aunque parece que hubo cierta interferencia cuando el gen fue un gen HA gripal, pero, curiosamente, hubo una mejor protección cuando el gen fue un gen de antígeno protector contra el carbunco. Además de los ratones, se protegieron ratas alodoneras contra las exposiciones al RSV después de la administración intranasal de partículas de AdE, 2 días o 30 días antes de la exposición.

Las realizaciones de la invención que emplean adenovirus recombinantes pueden incluir vectores de adenovirus defectuosos en E1, defectuosos en E3 y/o defectuosos en E4. La mutación de E1 eleva el margen de seguridad del vector debido a que los mutantes de adenovirus defectuosos en E1 son incompetentes en la replicación en células no permisivas. La mutación E3 aumenta la inmunogenicidad del antígeno al interrumpir el mecanismo mediante el que el adenovirus regula negativamente las moléculas de MHC de clase I. La mutación E4 reduce la inmunogenicidad del vector de adenovirus al suprimir la expresión génica tardía. Se pueden insertar motivos de secuencia específicos tales como el motivo RGD en el bucle H-I de un vector de adenovirus para mejorar su infectividad. Se construye un adenovirus recombinante clonando transgenes específicos o fragmentos de transgenes en cualquiera de los vectores de adenovirus tales como los descritos anteriormente.

La generación de partículas vacías de Ad5  $\Delta E1E3$  libres de transgenes puede llevarse a cabo como se describe en Tang D. C., Zhang J., Toro H., Shi Z., Van Kampen K. R. (2009) "Adenovirus as a carrier for the development of influenza virus-free avian influenza vaccines". *Expert Rev Vaccines* 8: 469-481.

La expresión "vector vírico", como se usa en el presente documento, incluye, pero sin limitación, retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, alfavirus y virus del herpes simple.

5 El adenovirus puede ser cualquier adenovirus, tal como, pero sin limitación, un adenovirus bovino, un adenovirus canino, un adenovirus de primate no humano, un adenovirus de pollo o un adenovirus porcino.

La expresión "adenovirus humano", como se usa en el presente documento, pretende englobar todos los adenovirus humanos de la familia *Adenoviridae*, que incluyen miembros de los géneros *Mastadenovirus*. Hasta la fecha, se han identificado más de cincuenta y un serotipos humanos de adenovirus (véase, por ejemplo, Fields *et al.*, *Virology* 2, Capítulo 67 (3ª ed., Lippincott-Raven Publishers)). El adenovirus puede ser del serogrupo A, B, C, D, E o F. El adenovirus humano puede ser de un serotipo 1 (Ad 1), serotipo 2 (Ad2), serotipo 3 (Ad3), serotipo 4 (Ad4), serotipo 6 (Ad6), serotipo 7 (Ad7), serotipo 8 (Ad8), serotipo 9 (Ad9), serotipo 10 (Ad10), serotipo 11 (Ad11), serotipo 12 (Ad12), serotipo 13 (Ad13), serotipo 14 (Ad14), serotipo 15 (Ad15), serotipo 16 (Ad16), serotipo 17 (Ad17), serotipo 18 (Ad18), serotipo 19 (Ad19), serotipo 19a (Ad19a), serotipo 19p (Ad19p), serotipo 20 (Ad20), serotipo 21 (Ad21), serotipo 22 (Ad22), serotipo 23 (Ad23), serotipo 24 (Ad24), serotipo 25 (Ad25), serotipo 26 (Ad26), serotipo 27 (Ad27), serotipo 28 (Ad28), serotipo 29 (Ad29), serotipo 30 (Ad30), serotipo 31 (Ad31), serotipo 32 (Ad32), serotipo 33 (Ad33), serotipo 34 (Ad34), serotipo 35 (Ad35), serotipo 36 (Ad36), serotipo 37 (Ad37), serotipo 38 (Ad38), serotipo 39 (Ad39), serotipo 40 (Ad40), serotipo 41 (Ad41), serotipo 42 (Ad42), serotipo 43 (Ad43), serotipo 44 (Ad44), serotipo 45 (Ad45), serotipo 46 (Ad46), serotipo 47 (Ad47), serotipo 48 (Ad48), serotipo 49 (Ad49), serotipo 50 (Ad50), serotipo 51 (Ad51) o preferentemente, serotipo 5 (Ad5), pero sin limitarse a estos ejemplos.

También se contemplan en la presente invención ligandos de unión al receptor, vectores recombinantes, composiciones de fármaco-vacuna y adenovirus recombinantes que pueden comprender partículas subvéricas de más de un serotipo de adenovirus. Por ejemplo, se sabe que los vectores de adenovirus pueden mostrar un tropismo alterado para tejidos o tipos de células específicos (Havenga, M. J. E. *et al.*, 2002) y, por lo tanto, la mezcla y la combinación de diferentes cápsulas adenovíricas, es decir, fibras o proteínas pentónicas de varios serotipos adenovíricos pueden ser ventajosas. La modificación de las cápsidas adenovíricas, incluyendo la fibra y el pentón, puede producir un vector adenovírico con un tropismo que es diferente del adenovirus no modificado. Los vectores de adenovirus que se modifican y optimizan en su capacidad de infectar células diana pueden permitir una reducción significativa de la dosis terapéutica o profiláctica, lo que resulta en una reducción de la toxicidad local y diseminada.

Los sistemas de administración génica de vectores víricos se usan comúnmente en aplicaciones de transferencia génica y terapia génica. Los diferentes sistemas de vectores víricos tienen sus propias ventajas y desventajas únicas. Los vectores víricos que pueden usarse para expresar el ligando derivado de patógenos de la presente invención incluyen, pero sin limitación, vectores adenovíricos, vectores víricos adenoasociados, vector de alfavirus, vector del virus del herpes simple y vectores retrovíricos, que se describen con más detalle a continuación.

Los vectores de adenovirus tienen muchas características que son ideales para la administración de genes, en especial, la administración en el tracto respiratorio. Los ejemplos de estas características incluyen:

- (a) la capacidad de los vectores de adenovirus para transducir tanto las células mitóticas como las posmitóticas *in situ*;
- (b) tecnología existente de preparación de reservas que contengan altos títulos de virus [superiores a  $10^{12}$  uif (unidades infecciosas) por ml] para transducir células *in situ* a alta multiplicidad de infección (MOI);
- (c) la inhalación de adenovirus cumple con la medicina evolutiva (Tang y Van Kampen, 2008);
- (d) la potencia de un vector de adenovirus administrado por vía intranasal no puede interferirse con la inmunidad preexistente hacia el adenovirus (Hoelscher *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2001; Van Kampen *et al.*, 2005); aunque no se desea quedar ligados a la teoría, esto puede atribuirse a la alta eficiencia de la administración de genes, alto nivel de expresión de transgenes y alto grado de presentación de antígenos a lo largo de la barrera de la mucosa en el tracto respiratorio;
- (e) la capacidad de los adenovirus para inducir altos niveles de expresión de transgenes (al menos como un estallido inicial); y
- (f) la facilidad con la que los vectores de adenovirus defectuosos en la replicación pueden ser obtenidos mediante bioingeniería.

Son características generales adicionales de los adenovirus que la biología del adenovirus se caracteriza en detalle; el adenovirus no está asociado con una patología humana grave; el adenovirus es sumamente eficiente en la introducción de su ADN en la célula hospedadora; el adenovirus puede infectar una amplia variedad de células y tiene una amplia selección de hospedadores; el adenovirus se puede producir en grandes cantidades con relativa facilidad; y el adenovirus se puede volver de replicación defectuosa y/o de no replicación mediante eliminaciones en la región 1 temprana ("E1") del genoma vírico.

Se hace referencia a la patente de EE.UU. n.º 5.990.091 expedida el 23 de noviembre de 1999, Einat *et al.* o Quark Biotech, Inc., documento WO 99/60164, publicado el 25 de noviembre de 1999 a partir del documento PCT/US99/11066, presentado el 14 de mayo de 1999, Fischer orRhone Merieux, Inc., documento WO98/00166, publicado el 8 de enero de 1998 a partir del documento PCT/US97/11486, presentado el 30 de junio de 1997 (que

reivindica la prioridad con respecto a las solicitudes de EE.UU. con n.º de serie 08/675.556 y 08/675.566), van Ginkel *et al.*, *J. Immunol* 159(2):685-93 (1997) ("Adenoviral gene delivery elicits distinct pulmonary-associated T helper cell responses to the vector and to its transgene") y Osterhaus *et al.*, "Immunobiology" 184(2-3):180-92 (1992) ("Vaccination against acute respiratory virus infections and measles in man"), para información sobre productos de genes expresados, anticuerpos y usos de los mismos, vectores para la expresión *in vivo* e *in vitro* de moléculas de ácido nucleico exógenas, promotores para la expresión de activación o para unirse operativamente a las moléculas de ácido nucleico que se van a expresar, método y documentos de producción de dichos vectores, composiciones que comprenden dichos vectores o moléculas de ácido nucleico o anticuerpos, dosis y modos y/o vías de administración (que incluyen composiciones para la administración nasal), entre otros, que pueden emplearse en la práctica de la presente invención; y, por lo tanto, la patente de EE.UU. n.º 5.990.091 expedida el 23 de noviembre de 1999, Einat *et al.* o Quark Biotech, Inc., documento WO 99/60164, publicado el 25 de noviembre de 1999 a partir del documento PCT/US99/11066, presentado el 14 de mayo de 1999, Fischer o Rhone Merieux, Inc., documento WO98/00166, publicado el 8 de enero de 1998 a partir del documento PCT/US97/11486, presentado el 30 de junio de 1997 (que reivindica la prioridad con respecto a las solicitudes de EE.UU. con n.º de serie 08/675.556 y 08/675.566), van Ginkel *et al.*, *J. Immunol* 159(2):685-93 (1997) ("Adenoviral gene delivery elicits distinct pulmonary-associated T helper cell responses to the vector and to its transgene") y Osterhaus *et al.*, *Immunobiology* 184(2-3):180-92 (1992) ("Vaccination against acute respiratory virus infections and measles in man") y todos los documentos citados o a los que se hace referencia en los mismos y todos los documentos citados o a los que se hace referencia en los documentos citados en cada una de las patentes de EE.UU. n.º 5.990.091 expedida el 23 de noviembre de 1999, Einat *et al.* o Quark Biotech, Inc., documento WO 99/60164, publicado el 25 de noviembre de 1999 a partir del documento PCT/US99/11066, presentado el 14 de mayo de 1999, Fischer o Rhone Merieux, Inc., documento WO98/00166, publicado el 8 de enero de 1998 a partir del documento PCT/US97/11486, presentado el 30 de junio de 1997 (que reivindica la prioridad con respecto a las solicitudes de EE.UU. con n.º de serie 08/675.556 y 08/675.566), van Ginkel *et al.*, *J. Immunol* 159(2):685-93 (1997) ("Adenoviral gene delivery elicits distinct pulmonary-associated T helper cell responses to the vector and to its transgene") y Osterhaus *et al.*, *Immunobiology* 184(2-3):180-92 (1992) ("Vaccination against acute respiratory virus infections and measles in man") se incorporan en el presente documento por referencia. La información de la patente de EE.UU. n.º 5.990.091 expedida el 23 de noviembre de 1999, el documento WO 99/60164, el documento WO98/00166, van Ginkel *et al.*, *J. Immunol* 159(2):685-93 (1997) y Osterhaus *et al.*, *Immunobiology* 184(2-3): 180-92 (1992) se puede basar en la práctica de la presente invención (por ejemplo, productos expresados, anticuerpos y usos de los mismos, vectores para la expresión *in vivo* e *in vitro* de moléculas de ácido nucleico exógenas, moléculas de ácido nucleico exógenas que codifican epítomos de interés, o antígenos o agentes terapéuticos y similares, promotores, composiciones que comprenden dichos vectores o moléculas de ácido nucleico, o productos o anticuerpos expresados, dosis, entre otros).

Se observa que los productos inmunológicos y/o anticuerpos y/o los productos expresados obtenidos de acuerdo con la presente invención pueden expresarse *in vitro* y usarse de una manera en la que normalmente se usan dichos productos inmunológicos y/o expresados y/o anticuerpos, y que las células que expresan dichos productos inmunológicos y/o expresados y/o anticuerpos pueden emplearse en aplicaciones *in vitro* y/o *ex vivo*, por ejemplo, dichos usos y aplicaciones pueden incluir diagnósticos, ensayos, terapia *ex vivo* (por ejemplo, en las que las células que expresan la el producto génico y/o la respuesta inmunológica se expanden *in vitro* y se vuelven a introducir en el hospedador o animal), etc., véase la patente de EE. UU. n.º 5.990.091, el documento WO 99/60164 y el documento WO 98/00166, y los documentos citados en los mismos.

Además, los anticuerpos expresados o productos génicos que se aíslan de los métodos del presente documento, o que se aíslan de células expandidas *in vitro* después de los métodos de administración del presente documento, se pueden administrar en composiciones, similares a la administración de epítomos o antígenos subunitarios o agentes terapéuticos o anticuerpos para inducir inmunidad, estimulan una respuesta terapéutica y/o estimulan la inmunidad pasiva. La cantidad que se vaya a administrar variará para el paciente (hospedador) y la afección que se esté tratando, y variará de uno o unos cuantos a unos cuantos cientos o miles de microgramos, por ejemplo, de 1 µg a 1 mg, de aproximadamente 100 ng/kg de peso corporal a 100 mg/kg de peso corporal al día y, preferentemente, será de 10 pg/kg a 10 mg/kg al día.

Se puede administrar un vector a un paciente u hospedador en una cantidad que sirva para alcanzar las cantidades indicadas para las composiciones de productos génicos (por ejemplo, epítomo, antígeno, agente terapéutico y/o anticuerpo). Como es evidente, la invención prevé dosis por debajo y por encima de las ilustradas en el presente documento, y para cualquier composición que se vaya a administrar a un animal o ser humano, incluyendo sus componentes, y para cualquier método de administración en particular, se prefiere determinar para ello: La toxicidad, tal como mediante la determinación de la dosis letal (DL) y la DL<sub>50</sub> en un modelo animal adecuado, por ejemplo, roedor tal como ratón; y la dosis de la una o varias composiciones, la concentración de los componentes en las mismas y la fecha de administración de la una o varias composiciones, que generan una respuesta adecuada, tal como mediante las titulaciones de los sueros y el análisis de los mismos, por ejemplo, mediante ELISA y/o análisis de seroneutralización. Dichas determinaciones no requieren una experimentación excesiva a partir de conocimiento del experto en la materia, la presente divulgación y los documentos citados en el presente documento. Y la invención también comprende la administración secuencial de las composiciones de la invención o el rendimiento secuencial de los métodos del presente documento, por ejemplo, la administración periódica de las composiciones de la

invención tal como en el curso de la terapia o del tratamiento para una afección y/o la administración de refuerzo de composiciones inmunológicas y/o en pautas de sensibilización-refuerzo; y, el tiempo y la forma para las administraciones secuenciales se pueden determinar sin una excesiva experimentación

5 La dosis del adenovirus de la presente invención puede ser de aproximadamente  $10^6$  uif a aproximadamente  $10^{10}$  uif. La dosis puede ser de aproximadamente  $10^6$  uif, aproximadamente  $10^7$  uif, aproximadamente  $10^8$  uif, aproximadamente  $10^9$  uif o aproximadamente  $10^{10}$  uif. En una realización ventajosa, la dosis es de aproximadamente  $10^6$  uif, aproximadamente  $10^7$  uif o aproximadamente  $10^8$  uif.

10 En una realización particularmente ventajosa, múltiples dosis del adenovirus de la presente invención. En una realización particularmente ventajosa, se administran aproximadamente dos dosis. En una realización ventajosa, las dosis se administran aproximadamente con 20 días de diferencia, aproximadamente 25 días de diferencia, aproximadamente 30 días de diferencia, aproximadamente 35 días de diferencia, aproximadamente 40 días de diferencia, aproximadamente 45 días de diferencia, aproximadamente 50 días de diferencia, aproximadamente 55 días de diferencia, aproximadamente 60 días de diferencia o aproximadamente 65 días de diferencia.  
15 Ventajosamente, las dosis se administran con aproximadamente 40 días de diferencia, aproximadamente 41 días de diferencia, aproximadamente 42 días de diferencia, aproximadamente 43 días de diferencia, aproximadamente 44 días de diferencia, aproximadamente 45 días de diferencia, aproximadamente 46 días de diferencia, aproximadamente 47 días de diferencia, aproximadamente 48 días de diferencia, aproximadamente 49 días de diferencia o aproximadamente 50 días de diferencia.  
20

Además, la invención comprende composiciones y métodos de fabricación y de uso de vectores, que incluyen métodos de producción de productos génicos y/o productos inmunológicos y/o anticuerpos *in vivo* y/o *in vitro* y/o *ex vivo* (por ejemplo, siendo estos últimos dos, por ejemplo, tras su aislamiento de células de un hospedador que ha  
25 tenido una administración no invasiva de acuerdo con la invención, por ejemplo, tras la expansión opcional de dichas células), y usos para dichos productos génicos y/o productos inmunológicos y/o anticuerpos, incluyendo en diagnósticos, ensayos, terapias, tratamientos y similares. Las composiciones vectoriales se formulan mezclando el vector con un vehículo o diluyente adecuado; y, el producto génico y/o el producto inmunológico y/o las composiciones de anticuerpos también se formulan mezclando el gen y/o el producto inmunológico y/o el anticuerpo  
30 con un vehículo o diluyente adecuado; véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 5.990.091, el documento WO 99/60164, el documento WO 98/00166, los documentos citados en los mismos, y otros documentos citados en los mismos, así como otras enseñanzas del presente documento (por ejemplo, con respecto a vehículos, diluyentes y similares).

35 En una realización ventajosa, el vector expresa un gen que codifica un antígeno de la gripe, un antígeno del RSV, un antígeno del VIH, un antígeno del SIV, un antígeno del VPH, un antígeno del VHC, un antígeno del VHB, un antígeno del CMV o un antígeno de *Staphylococcus*. La gripe puede ser gripe porcina, gripe estacional, gripe aviar, gripe H1N1 o gripe H5N1.

40 En otra realización ventajosa, el vector expresa un gen que codifica la hemaglutinina de la gripe, la proteína nuclear de la gripe, el M2 de la gripe, el fragmento C de la toxina del tétanos, el antígeno protector del carbunco, el factor letal del carbunco, la glicoproteína de la rabia, el antígeno de superficie del VHB, la gp 120 del VIH, la gp 160 del VIH, el antígeno carcinoembrionario humano, CSP de malaria, SSP de malaria, MSP de malaria, pfg de malaria, HSP de *Mycobacterium tuberculosis* o un mutante del mismo.  
45

En una realización de la invención, la respuesta inmune en el animal es inducida por vectores genéticos que expresan genes que codifican antígenos de interés en las células del animal. Los antígenos de interés se pueden seleccionar de cualquiera de los antígenos descritos en el presente documento.

50 En otra realización del método, las células del animal son células epidérmicas. En otra realización del método, la respuesta inmune es contra un patógeno o una neoplasia. En otra realización del método, el vector genético se usa como una vacuna profiláctica o una vacuna terapéutica. En otra realización de la invención, el vector genético comprende vectores genéticos capaces de expresar un antígeno de interés en las células del animal. En una realización adicional del método, el animal es un animal vertebrado.  
55

Con respecto al ADN exógeno para la expresión en un vector (por ejemplo, la codificación de un epítipo de interés y/o un antígeno y/o un agente terapéutico) y los documentos que proporcionan dicho ADN exógeno, así como con respecto a la expresión de la transcripción y/o los factores de traducción para potenciar la expresión de moléculas de ácido nucleico, y en expresiones tales como "epítipo de interés", "agente terapéutico", "respuesta inmune",  
60 "respuesta inmunológica", "respuesta inmune protectora", "composición inmunológica", "composición inmunogénica" y "composición de vacuna", entre otras, se hace referencia a la patente de EE.UU. n.º 5.990.091 expedida el 23 de noviembre de 1999 y el documento WO 98/00166 y el documento WO 99/60164, y los documentos citados en los mismos, así como los documentos registrados en el procesamiento de dicha patente y dichas solicitudes PCT; estando todos ellos incorporados en el presente documento por referencia. Por lo tanto, la patente de EE.UU. n.º  
65 5.990.091 y los documentos WO 98/00166 y WO 99/60164, y los documentos citados los mismos, así como los documentos o registros del procesamiento de dicha patente y dichas solicitudes PCT, y otros documentos citados en

el presente documento o incorporados de otro modo en el presente documento por referencia, pueden consultarse en la práctica de la presente invención; y todas las moléculas de ácido nucleico exógenas, promotores y vectores citados en los mismos se pueden usar en la práctica de la presente invención. En este sentido, también se hace mención a las patentes de EE.UU. n.º 6.004.777, 5.997.878, 5.989.561, 5.976.552, 5.972.597, 5.858.368, 5.863.542, 5.833.975, 5.863.542, 5.843.456, 5.766.598, 5.766.597, 5.762.939, 5.756.102, 5.756.101, 5.494.807.

En otra realización de la invención, el animal es ventajosamente un animal vertebrado tal como un mamífero, un ave, un reptil, un anfibio o un pez; más ventajosamente, un ser humano, o un animal de compañía o un animal doméstico o productor de alimentos o ganado, o un animal de carreras o deportivo, tal como una vaca, un perro, un gato, una cabra, una oveja o un cerdo o un caballo, o incluso aves como el pavo, los patos o el pollo. En otra realización especialmente ventajosa de la invención, el animal vertebrado es un ser humano.

En otra realización de la invención, el vector genético es un vector vírico, un vector bacteriano, un vector protozoario, un retrotransposón, un transposón, una cubierta de virus o un vector de ADN. En otra realización de la invención, el vector vírico, el vector bacteriano, el vector protozoario y el vector de ADN son vectores recombinantes. En otra realización de la invención, la respuesta inmune es contra la gripe A. En otra realización de la invención, la respuesta inmune contra la gripe A es inducida por el vector genético que expresa un gen que codifica una hemaglutinina de la gripe, una proteína nuclear de la gripe, un M2 de la gripe o un fragmento del mismo en las células del animal. En otra realización de la invención, el vector genético se selecciona del grupo que consiste en vector vírico y ADN plasmídico.

En otra realización de la invención, el vector genético es un adenovirus. En otra realización de la invención, el vector de adenovirus es defectuoso en su región E1. En otra realización de la invención, el vector de adenovirus es defectuoso en su región E3. En otra realización de la invención, el vector de adenovirus es defectuoso en sus regiones E1 y/o E3. En otra realización de la invención, el ADN está en forma de plásmido. En otra realización de la invención, la etapa de contacto comprende además disponer el vector genético que contiene el gen de interés en un dispositivo de administración y aplicar el dispositivo que tiene el vector genético que contiene el gen de interés en el mismo en la piel del animal. En otra realización de la invención, el vector genético codifica un gen inmunomodulador, como gen coestimulante o un gen de citocina. En otra realización de la invención, el vector tiene eliminados todos los genes víricos. En otra realización de la invención, el vector genético induce un efecto antitumoral en el animal. En una realización adicional de la invención, el vector genético expresa un oncogén, un gen supresor de tumores o un gen asociado a un tumor.

Los ejemplos representativos de antígenos que pueden usarse para producir una respuesta inmune usando los métodos de la presente invención incluyen hemaglutinina de la gripe, proteína nuclear de la gripe, M2 de la gripe, fragmento C de la toxina del tétanos, antígeno protector del carbunco, factor letal del carbunco, glicoproteína de la rabia, antígeno de la superficie del VHB, gp 120 del VIH, gp 160 del VIH, antígeno carcinoembrionario humano, CSP de la malaria, SSP de la malaria, MSP de la malaria, pfg de la malaria y HSP de *mycobacterium tuberculosis*, etc. Más preferentemente, la respuesta inmune produce un efecto protector contra los neoplasmas o los patógenos infecciosos.

En otra realización de la presente invención, el vector contiene además un gen seleccionado del grupo que consiste en genes coestimulantes y genes de citocinas. En este método, el gen se selecciona del grupo que consiste en un gen de GM-CSF, un gen de B7-1, un gen de B7-2, un gen de interleucina-2, un gen de interleucina-12 y genes de interferón.

Los vectores y métodos recombinantes de la presente invención se pueden usar en el tratamiento o la prevención de diversos patógenos respiratorios. Dichos patógenos incluyen, pero sin limitación, el virus de la gripe, el coronavirus asociado con el síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV), el rinovirus humano (HRV) y el virus respiratorio sincitial (RSV).

Además, la presente invención comprende el uso de más de un ligando, inmunógeno o antígeno terapéutico en los vectores y métodos desvelados en el presente documento, administrados en vectores recombinantes separados o juntos en un vector recombinante para proporcionar una vacuna multivalente o composición inmunogénica que estimule o module la respuesta inmunogénica hacia una o más cepas y/o híbridos de la gripe. Además, la presente invención engloba el uso de un ligando, inmunógeno o antígeno terapéutico de más de un patógeno en los vectores y métodos desvelados en el presente documento, administrados en vectores recombinantes separados o juntos en un vector recombinante.

Las realizaciones de la invención que usan complejos de ADN/adenovirus pueden tener ADN de plásmido formando un complejo con vectores de adenovirus utilizando un agente adecuado para ello, tal como PEI (polietiliminina) o polilisina. El vector de adenovirus dentro del complejo puede estar "vivo" o "muerto" por irradiación UV. El vector de adenovirus inactivado por UV como ligando de unión al receptor y un agente de endosomólisis para facilitar la transfección mediada por el ADN (Cotten *et al.*, 1992) pueden aumentar el margen de seguridad del vehículo vacunal. El complejo de ADN/adenovirus se usa para transfectar células epidérmicas de un vertebrado de un modo no invasivo para su uso como agente inmunizante.

Los vectores genéticos proporcionados por la invención también pueden codificar moléculas inmunomoduladoras que pueden actuar como un adyuvante para provocar una respuesta inmune humoral y/o celular. Dichas moléculas incluyen citocinas, moléculas coestimulantes o cualquier molécula que pueda cambiar el curso de una respuesta inmune. Se pueden concebir formas en las que esta tecnología se pueda modificar para mejorar aún más la inmunogenicidad de los antígenos.

En términos de la terminología usada en el presente documento, una cantidad inmunológicamente eficaz es una cantidad o concentración del vector genético que codifica el gen de interés, que, cuando se administra a un animal, produce una respuesta inmune hacia el producto génico de interés.

Se pueden administrar diversos epítomos, antígenos o agentes terapéuticos por vía tópica mediante su expresión a diferentes concentraciones. En general, las cantidades útiles para los vectores de adenovirus son al menos aproximadamente 100 ufp, y para el ADN plasmídico, al menos aproximadamente 1 ng de ADN. Se pueden determinar otras cantidades a partir de la presente divulgación y el conocimiento en la técnica, incluyendo los documentos citados e incorporados en el presente documento por referencia, sin excesiva experimentación.

Los métodos de la invención se pueden aplicar apropiadamente para prevenir enfermedades como la vacunación profiláctica o para tratar enfermedades como la vacunación terapéutica.

Las vacunas de la presente invención se pueden administrar a un animal ya sea solas o como parte de una composición inmunológica.

Más allá de las vacunas humanas descritas, el método de la invención se puede usar para inmunizar reservas de animales. El término animal significa todos los animales, incluyendo los seres humanos. Los ejemplos de animales incluyen seres humanos, vacas, perros, gatos, cabras, ovejas, caballos, cerdos, pavos, patos y pollos, etc. Dado que los sistemas inmunes de todos los vertebrados funcionan de manera similar, las aplicaciones descritas pueden implementarse en todos los sistemas vertebrados.

La presente invención también engloba combinaciones de vectores, en particular, vectores de adenovirus. Por ejemplo, se puede administrar un adenovector vacío (E1/E3 eliminado sin inserción) de manera secuencial o simultánea a un paciente que lo necesite junto con otro vector, tal como un adenovector, que tener eliminación de E1/E3 con una inserción, tal como un gen exógeno como se describe en el presente documento. Sin quedar vinculados a la teoría, el adenovector vacío (eliminación de E1/E3 sin inserción) puede provocar inicialmente una respuesta inmune rápida en la que un vector que expresa un gen exógeno, tal como un antígeno o epítomo, puede provocar una respuesta protectora adicional.

Aunque la presente invención y sus ventajas se han descrito en detalle, debe entenderse que pueden realizarse diversos cambios, sustituciones y alteraciones en el presente documento sin apartarse del espíritu ni del alcance de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas. La presente invención se ilustrará mejor en los siguientes ejemplos, que se proporcionan únicamente con fines ilustrativos y no pretenden limitar la invención de ninguna manera.

### Ejemplos

#### *Ejemplo 1: Partícula de adenovirus como un fármaco de amplio espectro contra patógenos respiratorios*

Aunque la vacunación es un enfoque eficaz para prevenir enfermedades infecciosas cuando se administra con semanas o meses de antelación, es demasiado lento para proteger a los animales o a las personas que corren un riesgo inmediato. Un agente capaz de reducir la gravedad de una infección cuando se toma poco antes o después de una infección es de suma importancia en la salud pública. El Tamiflu (fosfato de oseltamivir) y la Relenza (zanamivir) han demostrado ser eficaces en la prevención de infecciones por el virus de la gripe; sin embargo, estos inhibidores de la neuraminidasa pueden generar cepas de virus de la gripe resistentes al fármaco a lo largo del tiempo (Poland *et al.*, 2009). De manera similar a los virus, las bacterias resistentes a los fármacos también se generan comúnmente por el uso excesivo de fármacos (Davies y Davies, 2010). Por lo tanto, es urgente desarrollar fármacos adicionales, porque el personal médico tendrá la opción de usar otro fármaco en trámite para detener patógenos cuando un fármaco en uso se vea afectado por la resistencia a los fármacos.

El solicitante ha demostrado que la instilación intranasal de partículas de adenovirus (Ad) defectuosas en E1/E3 de 1 a 2 días antes de la exposición intranasal a una dosis letal del virus de la gripe podría conferir una protección rápida contra la gripe en ratones (FIG. 1). El solicitante también ha demostrado que la administración intranasal de Ad 1-2 días antes de la exposición intranasal a una dosis letal de esporas de *Bacillus anthracis* Sterne también fue capaz de proteger a los ratones contra el carbunco (FIG. 2 y 15). Es concebible que la administración intranasal de Ad induzca rápidamente una serie de reacciones que impidan el crecimiento de otros microbios en el tracto respiratorio.

Dado que el Ad se ha obtenido mediante bioingeniería en un vehículo de vacuna no replicante con un excelente perfil de seguridad en animales y seres humanos (Tang *et al.*, 2009), se concibe la posibilidad de desarrollar un

vector Ad que codifique un antígeno derivado de patógeno en un dúo de fármaco-vacuna (DVD), que sea capaz de conferir protección rápida y amplia contra una variedad de patógenos antes de inducir la inmunidad adaptativa; seguido de la generación de inmunidad protectora específica a patógenos como vacuna; en un solo paquete. Las FIG. 1 y 2 muestran que no solo la estructura principal del Ad (AdE) libre de transgénicos podría conferir una protección rápida contra virus y bacterias como un fármaco, sino que sus homólogos que codifican antígenos derivados de patógenos podrían detener a los patógenos como un fármaco.

Métodos de la FIG. 1. Se administran vectores de AdNC.H1.1 purificados que codifican el HA1 del virus de la gripe A/NC/20/99 (H1N1) y su homólogo libre de transgenes (AdE) gota a gota en un volumen de 0,05 ml en la fosa nasal de cada ratón BALB/c joven (de 2 meses) usando una pipeta mecánica como se describe (Shi *et al.*, 2001) antes de la exposición. Uno o dos días después de la administración del Ad, se expusieron los ratones por vía intranasal a una dosis letal (0,2 unidades de HA) del virus de la gripe A/PR/8/34 (H1N1) y se controlaron diariamente para determinar su supervivencia.

Resultados de la FIG. 1. Se protegió el setenta por ciento de los ratones (7/10) contra una dosis letal del virus de la gripe A/PR/8/34 vivo mediante la instilación intranasal del vector AdNC.H1.1 a una dosis de  $1,7 \times 10^8$  unidades infecciosas (uif) 2 días antes de la exposición (AdEin-2); se protegió el 100 % de los ratones (10/10) contra la gripe mediante la instilación intranasal del vector AdE a una dosis de  $1,7 \times 10^6$  uif 2 días antes de la exposición (AdEin-2); se protegió el 20 % de los ratones (2/10) contra la gripe mediante la instilación intranasal del vector AdE a una dosis de  $1,7 \times 10^6$  uif 2 días antes de la exposición (AdE\*en-2); se protegió el 90 % de los ratones (9/10) contra la gripe mediante la instilación intranasal del vector AdE a una dosis de  $1,7 \times 10^8$  uif 1 día antes de la exposición (AdEin-1); todos los ratones de control (control sin tratamiento previo) murieron en un plazo de los 10 días posteriores a la exposición. Los datos se representaron como el % de supervivencia frente a los días después de la exposición. Los números entre paréntesis representan la cantidad de animales de cada grupo.

Significación de la FIG. 1. La protección de los animales contra la gripe mediante la administración intranasal de un vector Ad 1 o 2 días antes de la exposición al virus de la gripe vivo muestra que la partícula de Ad es capaz de inducir rápidamente un estado antivírico en el tracto respiratorio. Dado que se han desarrollado vectores de Ad que codifican el virus de la gripe HA en vacunas contra la gripe (Hoelscher *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2009; Van Kampen *et al.*, 2005) y que el vector AdNC.H1.1 que codifica el A/NC/20/99 HA siguió confiriendo una rápida protección como el fármaco contra la gripe antes de generarse inmunidad adaptativa, hay pruebas convincentes de que este régimen representa un dúo de fármaco-vacuna (DVD) que puede conferir una protección amplia y rápida como fármaco antivírico seguida de la generación de inmunidad protectora como vacuna antivírica, en un solo envase.

Métodos de la FIG. 2. Se administran vectores de AdPA83 purificados que codifican el antígeno protector de *Bacillus anthracis* y su homólogo libre de transgenes (AdE) gota a gota en un volumen de 0,05 ml en la fosa nasal de cada ratón A/J joven (de 2 meses) usando una pipeta mecánica como se describe (Shi *et al.*, 2001) antes de la exposición. Uno o dos días después de la administración del Ad, se expusieron los ratones por vía intranasal a una dosis letal [ $1 \times 10^5$  unidades formadoras de colonias (ufc)] de esporas de *B. anthracis* Sterne y se controlaron diariamente para determinar su supervivencia.

Resultados de la FIG. 2. Se protegió el sesenta y siete por ciento de los ratones (6/9) contra una dosis letal de esporas de carbunco mediante la instilación intranasal del vector AdPA83 a una dosis de  $1,3 \times 10^8$  uif 2 días antes de la exposición (AdPAin-2); se protegió el 30 % de los ratones (3/10) contra el carbunco mediante la instilación intranasal del vector AdE a una dosis de  $1,3 \times 10^8$  uif 2 días antes de la exposición (AdEin-2); no se protegió ningún ratón (0/9) contra el carbunco mediante la instilación intranasal del vector AdE a una dosis de  $1,3 \times 10^6$  uif 2 días antes de la exposición (AdE\*en-2); se protegió el 22 % de los ratones (2/9) contra el carbunco mediante la instilación intranasal del vector AdE a una dosis de  $1,3 \times 10^8$  uif 1 día antes de la exposición (AdEin-1); todos los ratones de control (control sin tratamiento) murieron en el plazo de los 4 días posteriores a la exposición. Los datos se representaron como el % de supervivencia frente a los días después de la exposición. Los números entre paréntesis representan la cantidad de animales de cada grupo.

Significación de la FIG. 2. La protección de los animales contra el carbunco mediante la administración intranasal de un vector Ad 1 o 2 días antes de la exposición a esporas de carbunco muestra que la partícula de Ad es capaz de inducir rápidamente un estado antibacteriano en el tracto respiratorio. Dado que se han desarrollado vectores de Ad que codifican el PA en vacunas contra el carbunco (McConnell *et al.*, 2007) y que el vector AdPA83 que codifica el PA siguió confiriendo una rápida protección como el fármaco contra el carbunco antes de generarse inmunidad adaptativa, hay pruebas convincentes de que este régimen representa un dúo de fármaco-vacuna (DVD) que puede conferir una protección rápida como fármaco antibacteriano seguida de la generación de inmunidad protectora como vacuna antibacteriana, en un solo envase.

## Referencias

- Davies, J. y Davies, D. (2010). "Origins and evolution of antibiotic resistance". *Microbiol Mol Biol Rev* 74,417-433.  
 Hoelscher, M. A., Garg, S., Bangari, D. S., Belsler, J. A., Lu, X., Stephenson, I., Bright, R. A., Katz, J. M., Mittal, S. K. y Sambhara, S. (2006). "Development of adenoviral-vector-based pandemic influenza vaccine against

antigenically distinct human H5N1 strains in mice". *Lancet* 367,475-481.

McConnell, M. J., Hanna, P. C. y Imperiale, M. J. (2007). "Adenovirus-based prime-boost immunization for rapid vaccination against anthrax". *Mol Ther* 15,203-210.

5 Poland, G. A., Jacobson, R. M. y Ovsyannikova, I. G. (2009). "Influenza virus resistance to antiviral agents: a plea for rational use". *Clin Infect Dis* 48, 1254.1256.

Shi, Z., Zeng, M., Yang, G., Siegel, F., Cain, L. J., Van Kampen, K. R., Elmets, C. A. y Tang, D. C. (2001). "Protection against tetanus by needle-free inoculation of adenovirus-vectored nasal and epicutaneous vaccines". *J Virol* 75, 11474-11482.

10 Tang, D. C., Zhang, J., Toro, H., Shi, Z., and Van Kampen, K. A. (2009). "Adenovirus as a carrier for the development of influenza virus-free avian influenza vaccines". *Expert Rev Vaccines* 8, 469-481.

Van Kampen, K. R., Shi, Z., Gao, P., Zhang, J., Foster, K. W., Chen, D. T., Marks, D., Elmets, C. A., and Tang, D. C. (2005). "Safety and immunogenicity of adenovirus-vectored nasal and epicutaneous influenza vaccines in humans". *Vaccine* 23, 1029.1036.

15 *Ejemplo 2: Dúo de vacuna-fármaco vectorizado con adenovirus como una herramienta de respuesta rápida para conferir protección completa contra la gripe*

Otras cuantas enfermedades ejercen un gran número de dolencias como la gripe. El solicitante informa en el presente documento que la administración intranasal (i.n.) de partículas de adenovirus de serotipo 5 (Ad5) defectuosas en E1/E3 ( $\Delta E1E3$ ) indujo rápidamente un estado antigripal como medio de terapia profiláctica que perduró durante varias semanas en ratones. Al codificar un dominio HA1 de la hemaglutinina (HA) del virus de la gripe (IFV), un vector Ad5-HA1 confirió protección rápida como fármaco profiláctico seguida de la generación de inmunidad protectora sostenida como vacuna para inducir una protección completa contra la gripe como dúo de fármaco-vacuna (DVD) en un solo envase. Dado que las partículas de Ad5 inducen una compleja red de respuestas en el hospedador, que podría detener la gripe al activar un grupo específico de inmunidad innata para impedir el crecimiento de IFV en las vías respiratorias, es posible que este DVD de la gripe múltiple pueda escapar de la resistencia a los fármacos que afecta a los fármacos antigripales actuales.

30 La gripe es una enfermedad emergente y resurgente que prácticamente no tiene la posibilidad de erradicar el virus causal que desencadena la gripe estacional, así como la gripe pandémica. Como enfermedad zoonótica con el potencial de enfermar tanto a los animales como a los seres humanos [1], se puede generar un IFV de diseño rápidamente mediante genética inversa [2] y ser diseminado por terroristas para arrasar la agricultura, la sanidad pública y la economía dentro de una región específica. A pesar de que esta enfermedad altamente contagiosa y potencialmente mortal se ha controlado parcialmente mediante la vacunación, la vacuna contra la gripe autorizada es difícil de producir en masa [1] y no puede conferir la protección oportuna y amplia contra las cepas heterosubtípicas de IFV [3]. Otra línea de defensa contra la gripe es el uso de fármacos contra la gripe [por ejemplo, oseltamivir (Tamiflu); zanamivir (Relenza)]; sin embargo, esta opción está limitada por la aparición del IFV resistente a los fármacos, debido a la selección bajo presión mutacional [4,5].

40 Para desarrollar un agente antigripal de respuesta rápida, se demostró de forma fortuita que una vacuna contra la gripe nasal vectorizada con Ad5 podría conferir una protección rápida contra la gripe de forma similar a un fármaco. Un vector Ad5 libre de adenovirus (RCA) de replicación competente codificante antígenos patógenos, por lo tanto, puede conferir una protección completa contra los patógenos de las mucosas como un DVD en una amplia variedad de entornos clínicos. Los vectores Ad5 libres de RCA pueden producirse rápidamente en masa en células de suspensión de PER.C6 sin suero; administrase sin dolor en masa por pulverización nasal [1]; seguidos de la generación de respuestas inmunes innatas, así como adaptativas, frente a la inmunidad preexistente hacia el Ad5. En el caso de un DVD de la gripe, la posibilidad de generar IFV resistente a fármacos es mínima, ya que las partículas de Ad5 pueden inducir un estado antigripal sin atacar directamente al IFV. En contraste con una vacuna de IFV vivo atenuado (LAIV), un DVD vectorizado con Ad5 no se replica y no se reasigna con el IFV silvestre. Se espera que el pulverizado nasal de un DVD de la gripe vectorizado con Ad5 pueda conferir una protección amplia contra las cepas heterosubtípicas de IFV durante varias semanas como fármaco profiláctico; seguido de la generación de la inmunidad protectora específica de la cepa como vacuna durante meses o incluso años antes de que decaiga la protección inducida por el fármaco. Este nuevo régimen puede añadir una herramienta de respuesta rápida al arsenal de salud pública contra la gripe y otras enfermedades si los efectos protectores del DVD deben reproducirse en sujetos humanos.

60 La partícula de Ad5  $\Delta E1E3$  como agente antigripal. Se generaron la partícula vacía de Ad5 (AdE)  $\Delta E1E3$  libre de transgenes y su homólogo AdNC.H1.1 codificante del dominio HA1 del IFV A/Nueva Caledonia/20/99 H1N1 (NC20) en las células PER.C6 como se describe [1]. Como se muestra en la FIG. 3<sup>a</sup>, la instilación i.n. de  $1,7 \times 10^8$  unidades infecciosas (uif) de AdE 2 días (día -2) antes de la exposición protegió al 100 % (10/10) de los ratones contra una dosis letal del IFV H1N1 A/Puerto Rico vivo/8/34 (PR8) ; solo el 20 % (2/10) de los animales estaban protegidos cuando la dosis de AdE se redujo 100 veces a  $1,7 \times 10^6$  uif; y no hubo protección cuando se administraron  $1,7 \times 10^8$  uif de AdE en ratones mediante instilación i.n. 1 día después de la exposición a PR8 o por inyección i.m. el día -2. La inserción del dominio HA1 de NC20 en el genoma de AdE interfirió levemente con la capacidad de Ad5 s  $\Delta E1E3$  para inducir un estado antigripal, ya que solo se estaba protegido el 70 % (7/10) de los animales cuando se administraron i.n.  $1,7 \times 10^8$  uif de AdNC.H1.1 en ratones el día -2. Al igual que AdE, la instilación i.n. de  $1,7 \times 10^6$  uif

ni la inyección i.m. de  $1,7 \times 10^8$  uif de AdNC.H1.1 confirieron protección contra PR8 cuando se administraron el día -2 (FIG. 3). La protección ofrecida por la administración i.n. de AdE ( $p = 0,0001$ ) o AdNC.H1.1 ( $p = 0,0077$ ) a una dosis de  $1,7 \times 10^8$  uif en el día -2 alcanzó significación estadística en comparación con el grupo de control no tratado (mediante ensayos de rango logarítmico).

La administración intranasal de AdE el día -47 (47 días antes de la exposición a PR8) protegió al 70 % de los animales (7/10), lo que demuestra que el estado antigripal inducido por AdE podría perdurar durante varias semanas (FIG. 4 A). La instilación intranasal de AdNC.H1.1 en el día -47 protegió al 100 % (10/10) de los ratones (FIG. 4 A) presumiblemente debido a la inmunidad adaptativa inducida por HA1 de NC20 que reaccionó de forma cruzada con PR8 incluso sin la detección de anticuerpos de inhibición de la hemaglutinación en suero (HI) hacia PR8 (Tabla 1). A diferencia de la inmunización con AdNC.H1.1 en el día -47 que generó altos títulos de anticuerpos HI hacia NC20 y títulos indetectables hacia PR8, la exposición a PR8 indujo altos títulos de anticuerpo HI hacia PR8 y bajos títulos hacia NC20 en los supervivientes, y la administración bien de AdE o de AdNC.H1.1 en el día -2 no indujo títulos de HI hacia NC20 ni hacia PR8 (Tabla 1). La protección ofrecida por la administración i.n. de AdNC.H1.1 en el día -47 ( $p = 0,0001$ ), AdE en el día -47 ( $p = 0,0032$ ), pauta de dosis doble de AdE (día -47 seguido de una aplicación de refuerzo en el día -2) ( $p = 0,0001$ ), AdE en el día -1 ( $p = 0,0001$ ) o -2 ( $p = 0,0005$ ) a una dosis de  $1,2 \times 10^8$  uif alcanzaron significación estadística en comparación con la del grupo de control no tratado.

**Tabla 1: Títulos de anticuerpos HI en suero inducidos por la inmunización de AdNCH1.1 y la exposición a PR8**

Inmunización	<i>n</i>	Día de recogida del suero	Log <sub>2</sub> [GMT de HI anti-NC20] (± DT)	Seroconversión en NC20 (%)	Log <sub>2</sub> [GMT de HI anti-PR8] (± DT)	Seroconversión en PR8 (%)
<sup>a</sup> AdNC/in/-2 + PR8	7	19	7,9 (± 0,5)	100	8,9 (± 0,5)	100
<sup>a</sup> AdE/in/-2 + PR8	10	19	5,3 (± 0,7)	100	7,5 (± 0,6)	100
<sup>b</sup> AdNC/in/-47	10	-1	10,2 (± 1,7)	100	2,3 (± 0)	0
<sup>b</sup> AdNC/in/-2	10	-1	2,3 (± 0)	0	2,3 (± 0)	0
<sup>b</sup> AdE/in/-2	10	-1	2,3 (± 0)	0	2,3 (± 0)	0
<sup>b</sup> Control sin tratar	10	-1	2,3 (± 0)	0	2,3 (± 0)	0

Los anticuerpos HI se midieron frente al respectivo IFV, expresándose los títulos como GMT a una escala log<sub>2</sub>; se asignó arbitrariamente un log<sub>2</sub> del título de 2,3 a muestras con títulos no detectables; cada muestra de suero se procesó en pocillos por triplicado;

<sup>a</sup>animales descritos en la Fig.1 con sueros recogidos 19 días después de la exposición a PR8;

<sup>b</sup>animales descritos en la Fig. 2 con sueros recogidos 1 día antes de la exposición a PR8. La seroconversión se definió como un aumento  $\geq 4$  veces en el título de HI por encima de la línea basal preinmune; *n*, número de animales; GMT, media geométrica de los títulos; DT, desviación típica.

Doi:10.1371/journal.pone.0022605.t001.

Aunque varias pautas protegieron a los ratones contra la mortalidad mediada por la gripe, la pauta de dosis doble de AdE tendió a conferir una protección más sólida que su homóloga a una sola dosis (día -47 o -2), como lo demuestra una menor pérdida de peso corporal después de la exposición a PR8, aunque la diferencia no alcanzó significación estadística (FIG. 5). Para inducir un estado antigripal, es esencial eliminar E1 y/o E3, ya que el Ad5 de tipo silvestre E1+/E3+ no pudo detener la gripe después de la administración i.n. en ratones en condiciones idénticas (FIG. 4 B).

Protección inducida por Ad5 del pulmón contra la gripe. Como se muestra en la histopatología pulmonar después de la exposición a PR8, la administración i.n. de AdE o AdNC.H1.1 en el día 2 protegió a los ratones contra la gripe al evitar el desarrollo de lesiones pulmonares graves. La instilación intranasal de PR8 sin protección de Ad5 indujo una inflamación pulmonar masiva 19 días después del ensayo de ANOVA de una vía con los post-test de múltiples comparaciones de Turkey) 7 días después de la exposición a PR8.

Protección contra una cepa pandémica de IFV. Para demostrar que las partículas de Ad5  $\Delta E1E3$  pueden proteger a los ratones no solo contra PR8, sino también contra una cepa de IFV más clínicamente relevante, se administraron i.n.  $2,5 \times 10^8$  uif de AdE o AdNC.H1.1 a ratones seguido de la exposición de los animales a una dosis letal del aislado de gripe porcina pandémica H1N1 2009 A/California/04/2009 (CA04). Como se muestra en la FIG. 8, se protegió el 100 % (10/10) de los animales mediante la instilación i.n. de AdE o AdNC.H1.1 en el día -2 y AdNC.H1.1 en el día -22; se protegió el 90 % (9/10) mediante la administración i.n. de AdE en el día -22. La protección ofrecida frente a CA04 en todos estos grupos expuestos a Ad5 alcanzó significación estadística en comparación con la del grupo de control de placebo ( $p = 0,0001$ ).

El vector Ad5  $\Delta E1E3$  no replicante ha sido obtenido por bioingeniería en un vehículo de vacuna contra la gripe nasal con alta potencia y excelente perfil de seguridad [1]. Además de la generación de inmunidad protectora como vacuna, en el presente documento, se muestra que esta clase de vacuna también puede conferir terapia profiláctica contra la gripe antes de generarse la inmunidad adaptativa. Se ha documentado que la administración de partículas de Ad5  $\Delta E1E3$  en ratones induce rápidamente la producción de una amplia selección de citocinas y quimiocinas inflamatorias [6], incluyendo el interferón de tipo I (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ) [7]; afecta a las células dendríticas pulmonares [8];

activa los linfocitos citotóxicos naturales [9]; induce la producción del óxido nítrico antivírico [10]; desencadena interacciones multifacéticas entre Ad5 y proteínas de la sangre, plaquetas, macrófagos, células endoteliales y las respectivas células parenquimatosas [6]. La inhibición de la inflamación asociada a Ad5 por proteínas E1A, E1B y E3 de Ad5 [11] sugiere que la incompetencia de Ad5 E1+/E3+ para inducir un estado antigripal (FIG. 4) puede atribuirse a la supresión de la inflamación, aunque no se pueden excluir otros mecanismos, ya que las partículas de Ad5 ΔE1E3 inducen muchas respuestas inmunes y no inmunes, y algunas reacciones permanecen indefinidas en animales [12]. Puede ocurrir que múltiples reacciones inducidas por las partículas de Ad5 ΔE1E3 puedan integrarse para establecer un estado antigripal en las vías respiratorias, creando así una barrera de defensa multidimensional que difícilmente pueda ser sobrepasada por un IFV. Esta hipótesis está respaldada por el hallazgo de que el receptor de IFN- $\alpha/\beta$  proporciona protección contra la gripe de forma prescindible, lo que demuestra que los animales han desarrollado mecanismos de solapamiento para responder a la gripe [13]. Además, los ratones Balb/c expuestos en estos estudios portan un alelo defectuoso del factor de resistencia a la gripe inducido por IFN- $\alpha/\beta$  M31 [14], lo que implica que la producción inducida por Ad5 ΔE1E3 de IFN de tipo I [7] puede no desempeñar un papel importante durante el establecimiento de un estado antigripal en esta cepa de ratón.

El hallazgo de que la administración i.n. de AdE 1 día después de la exposición a PR8 fue incapaz de detener la gripe (FIG. 3 A) sugiere que el IFV puede inducir un estado progripal que no se vea alterado por la partícula de Ad5 ΔE1E3 cuando el primero se introduce en la vía respiratoria antes que la segunda, similar al estado antigripal inducido por Ad5 que no puede ser revertido por un IFV cuando las partículas de AdE se administraron i.n. antes de PR8 o CA04 (Figuras 3-9). Para desarrollar aún más el fármaco profiláctico basado en Ad5 ΔE1E3 en un fármaco para la gripe para después de la exposición, es crucial caracterizar las reacciones antagónicas inducidas por los dos tipos de virus en las vías respiratorias

La exposición previa a Ad5 se ha asociado con la pérdida de la potencia de Ad5 cuando este vector se inyecta i.m. [15]. Sin embargo, la evidencia emergente muestra que una vacuna nasal vectorizada con Ad5 puede eludir la inmunidad preexistente hacia el Ad5 en ratones [15], macacos [16] y seres humanos [17] probablemente debido a la administración de genes de alta eficiencia en células de la capa superficial a lo largo la barrera de la mucosa en combinación con la presentación de antígenos potentes asociada con este tejido de superficie de contacto inmunocompetente. La sinergia entre las aplicaciones primarias y de refuerzo inducidas por la pauta de dosis doble de AdE (FIG. 4A y 5) muestra que las respuestas rápidas contra la gripe inducidas por AdE eran aditivas en presencia de inmunidad hacia el Ad5 preexistente. Estos hallazgos prometen que este DVD de gripe nasal no solo puede inducir una protección rápida y sostenida contra la gripe en una pauta de una sola dosis, sino que también puede administrarse repetidamente (por ejemplo, cuando se requiere un HA diferente para su componente de vacuna) sin perder potencia.

Aunque la terapia profiláctica contra la gripe se puede realizar mediante la administración i.n. de lisados bacterianos complejos [18] o toxinas bacterianas [19], el estado antigripal inducido por los componentes bacterianos fue muy transitorio, disminuyendo sus efectos protectores a los pocos días de la terapia [18,19]. El hallazgo de que los efectos protectores inducidos por AdE podrían perdurar durante al menos 3 semanas (FIG. 8) y hasta 47 días (FIG. 4 A) en una pauta de una sola dosis sugiere que los mecanismos subyacentes entre los estados antigripales inducidos por componentes bacterianos y por Ad5 pueden diferir. Además, solo este último permitiría suficiente tiempo para que el componente vacunal del DVD genere inmunidad adaptativa antes de que disminuyan sus efectos farmacológicos. Además, el Ad5 de tipo silvestre replicante es un virus respiratorio benigno y su homólogo no replicante usado en este estudio debería ser incluso más seguro; en particular, se ha demostrado el perfil de seguridad de una vacuna contra la gripe nasal vectorizada con Ad5 en sujetos humanos [17]. Como virus respiratorio común, el sistema inmune de la mucosa humana está familiarizado con las partículas de Ad5 y debe haber desarrollado mecanismos de protección específicos de Ad5. Por el contrario, la administración de una toxina bacteriana asociada con el tracto digestivo en el tracto respiratorio como fármaco contra la gripe [19] sorprendería al sistema inmune, y este régimen no natural se ha asociado con la inducción de la parálisis de Bell en sujetos humanos [20].

El IFV es insidioso en la mutación en cepas resistentes a los fármacos cuando es atacado por un fármaco contra la gripe [por ejemplo, el bloqueador del canal iónico M2 (amantadina, rimantadina) o el inhibidor de la neuraminidasa (oseltamivir; zanamivir)] [5]. A diferencia de los fármacos contra la gripe contemporáneos, cabe pensar que el DVD vectorizado con Ad5 modifica el hábitat en el tracto respiratorio sin atacar directamente al IFV; por lo tanto, el DVD no confiere presión mutacional para inducir resistencia a los fármacos. En contraste con la supresión inducida por oseltamivir de la inmunidad de la mucosa con el riesgo de aumentar la vulnerabilidad a las infecciones posteriores de patógenos de la mucosa [21], el DVD vectorizado con Ad5 mejora la inmunidad innata de la mucosa contra al menos un subconjunto de patógenos de la mucosa. La eficacia del DVD se fortalece aún más por su componente vacunal, que genera inmunidad adaptativa sostenida antes de que sus efectos farmacológicos desaparezcan por completo (FIG. 4A, 8 y Tabla 1). Dado que la LAIV autorizado (por ejemplo, Fluvaxim en EE. UU.) contiene el IFV vivo [1], la administración conjunta de LAIV con un fármaco de la gripe sería contraproducente, porque el fármaco deshabilitaría la vacuna al matar al IFV vivo. El DVD vectorizado con Ad5 no solo es compatible con un fármaco contra la gripe autorizado, sino que también confiere terapia profiláctica como un fármaco por sí mismo, además de la capacidad de su vacuna.

Las pruebas emergentes muestran que una serie de vacunas nasales inducen una respuesta inmune adaptativa sistémica más débil que sus homólogos parenterales [22-26], a pesar de que las vacunas nasales confieren una protección más sólida contra un patógeno de la mucosa respiratoria, generando una respuesta inmune adaptativa de la mucosa más potente [22,25]. El solicitante proporciona pruebas de que no solo se podría inducir inmunidad adaptativa, sino también inmunidad innata con un enfoque en el tracto respiratorio contra patógenos de la mucosa cuando la partícula de Ad5 ΔE1E3 se administra i.n., pero no i.m., como se muestra por el % de supervivencia proporcionado por las vías i.n. e i.m., respectivamente (FIG. 3). Aún está por verse si el DVD nasal con vector de Ad5 puede conferir protección contra la gripe inducida por otras vías (por ejemplo, infección oral).

El hallazgo de que la administración i.n. de AdNC.H1.1 el día -47 indujo una protección más sólida contra la exposición a PR8 que su homólogo inoculado el día -2 o AdE administrada el día -47 (FIG. 3B y 4A) sugiere que los animales del grupo AdNC/in/-47 pueden ser protegidos por una respuesta inmune adaptativa mediada por HA1 NC20 que reacciona de forma cruzada con PR8 47 días después de la inmunización en ausencia de anticuerpo HI en suero detectable hacia PR8 (Tabla 1). Los datos corroboran otros informes que indican que el título de anticuerpos HI en suero es un marcador sustituto inadecuado para predecir la inmunidad protectora inducida por una vacuna contra la gripe nasal [24,26].

Los hallazgos de que el DVD vectorizado con Ad5 pueden conferir terapia profiláctica junto con la vacunación en un solo envase proporcionan una base para el desarrollo de un nuevo agente antigripal que puede producirse en masa en células cultivadas, administrarse sin dolor por pulverización nasal, con la capacidad de eludir la inmunidad preexistente hacia el Ad5 y movilizar los repertorios inmunes innatos, así como adaptativos, hacia una respuesta beneficiosa rápida y sostenida contra la gripe, sin el potencial de generar cepas de IFV resistentes a los fármacos.

Adenovirus. Para generar la partícula de AdE, se realizó la recombinación homóloga entre los plásmidos pAdHigh de lanzadera y pAdEasy-1 de la estructura principal de Ad5 en células BJ5183 de *Escherichia coli* seguida de la generación de la partícula de AdE libre de RCA en células PER.C6 (proporcionadas por Crucell Holland BV; Leiden, Países Bajos) como se describe [1]. AdE es, por tanto, un Ad5 ΔE1E3 con un casete de expresión en su región EI [1] sin la codificación de ningún transgén. Para generar el vector AdNC.H1.1, se sintetizó el gen HA NC20 en GENEART (Regensburg, Alemania) con codones optimizados para coincidir con la combinación de ARNt encontrada en las células humanas junto con la inserción de un sitio de unión ribosomal eucariota inmediatamente cadena arriba del codón ATG de iniciación [27]. Se amplificó el fragmento de HA1 NC20 que contenía 347 aminoácidos a partir del molde de HA sintético mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando los cebadores 5'-CACAGGTACCGCCACCATGAAGGCCAAGCTG-3' y 5'-GAGTCTAGATTATCAGCCGAACAGGCCTCTGCTCTGG-3'. Se insertó el fragmento KpnI-XbaI que contiene el fragmento de HA1 amplificado con un codón de terminación añadido en marco en el sitio KpnI-XbaI de pAdHigh en la orientación correcta bajo el control de la transcripción del promotor temprano del citomegalovirus humano (CMV). Posteriormente, se generó un vector Ad5 libre de RCA codificante de HA1 NC20 (AdNC.H1.1) en las células PER.C6 como se ha descrito anteriormente. Tanto AdE como AdNC.H1.1 fueron validados mediante secuenciación de ADN; producidos en masa en las células PER.C6; purificados mediante ultracentrifugación sobre un gradiente de cloruro de cesio como se describe [27]; sometidos a diálisis en tampón A195 [28] con títulos (uif por ml) determinados en 293 células [17] mediante el método de Spearman-Kärber [29] después de teñir monocapas infectadas con Ad5 con un anticuerpo anti-hexón de Ad5 conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) y el sustrato de tetraclorhidrato de 3,3'-diaminobencidina (DAB) (Clontech Laboratories, Inc. ; Mountain View, CA). El Ad5 de tipo silvestre E1+/E3+ (VR-1516) se obtuvo de colección americana de cultivos tipo (ATCC; Manassas, VA).

Virus de la gripe. El PR8 (VR-95) se obtuvo de la ATCC y se cultivó en células renales caninas de Madin Darby (MDCK) en presencia de TPCK-tripsina como se describe [17] con los títulos determinados por el ensayo de placas [30]. El CA04 adaptado al ratón fue generado por Natalia A. Ilyushina y fue proporcionado por Elena Govorkova del Hospital de Investigación Infantil St. Jude (Memphis TN). El virus CA04 se adaptó a la replicación en los pulmones de ratones Balb/c mediante 9 pasos secuenciales a través de pulmones de ratón. El virus se purificó en placas en células MDCK y se preparó una reserva de virus mediante el crecimiento en huevos de pollo embrionados de 10 días y luego en células MDCK como se describe [31] con títulos expresados como dosis infecciosas de cultivo celular (CCID50) como se describe [32]. NC20 fue proporcionado por el Centro para el Control de Enfermedades (CDC; Atlanta, GA).

Estudios de exposición. Se realizaron la administración intranasal y la inyección i.m. de 50 µl de partículas de Ad5 en ratones Balb/c hembra jóvenes (de aproximadamente 2 meses) como se describe [27]. Los ratones se expusieron mediante la instilación i.n. de 50 µl de PR8 que contenían  $1,4 \times 10^6$  unidades formadoras de placa (ufp) [equivalentes a aproximadamente  $4 \times DL_{50}$  (dosis letal del 50 %)] o  $3,5 \times 10^6$  ufp (equivalentes a aproximadamente  $10 \times DL_{50}$ ) en la Universidad de Alabama en Birmingham (UAB), así como 90 µl de CA04 que contenía 26105 CCID50 (equivalentes a aproximadamente  $3 \times DL_{50}$ ) en la Universidad Estatal de Utah (USU). Todos los experimentos en los que se usaron ratones se realizaron de acuerdo con la aprobación de los comités institucionales de cuidado y uso de animales en UAB y USU (ID de aprobación de UAB, n.º 7705; número de garantía del bienestar del animal de UAB A3255-01; ID de aprobación de USU n.º 552; número de garantía del bienestar del animal de USU, A3801-01). Las instalaciones para los animales tanto en UAB como en USU han sido acreditadas por AAALAC.

Títulos de PR8 en los pulmones después de la exposición. Se administraron i.n. partículas de AdE en ratones Balb/c jóvenes hembra a una dosis de  $1,2 \times 10^8$  uif en un volumen de 50  $\mu$ l el día -2. De cinco a siete días después de la instilación i.n. de  $4,6 \times 10^6$  ufp de PR8 el día 0, se congelaron de inmediato los pulmones de los ratones expuestos al control y a AdE en hielo seco después de la resección y se almacenaron a 280 uC hasta el análisis (FIG. 7).  
 5 Después de la descongelación, se pesó una fracción de cada pulmón y se homogeneizó en solución salina tamponada con fosfato frío (PBS) como una suspensión al 10 % (p/v). Se retiraron los desechos de tejidos por centrifugación y se transfirió el sobrenadante a otro tubo estéril para la titulación del virus. El ensayo de placa del IFV se realizó como se describe [30].

10 Ensayo de inhibición de la hemaglutinación. Se ensayaron los sueros para determinar su actividad frente a PR8 o NC20 mediante el ensayo de HI convencional después del tratamiento previo de los sueros con una enzima destructora del receptor como se ha descrito [17]. Se ensayó cada muestra de suero comenzando a una dilución de 1:10. Todos los sueros se ensayaron con ocultación en muestras antes y después de la inmunización marcadas con código. Los animales se consideraron seronegativos y se les asignó un título de anticuerpos HI de 5 (2,3 en una  
 15 escala log<sub>2</sub>) si su muestra de suero tenía un título de HI de <10.

20 Ensayo de histopatología pulmonar. Se fijaron los pulmones del ratón perfundiendo formalina tamponada al 10 % a través de la tráquea. Los tejidos embebidos en parafina se cortaron en cortes de 5  $\mu$ m de espesor seguido de secciones de tinción con hematoxilina y eosina (FIG. 6).

25 Análisis estadístico. Todos los análisis estadísticos se realizaron usando GraphPad Prism versión 5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA). Se realizaron pruebas de rango logarítmico para comparar las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier; y se realizaron un ANOVA de una vía con post-test de comparación múltiple de Turkey para comparar la pérdida de peso corporal, así como los títulos de PR8 en los pulmones. La significación estadística se estableció en  $p = 0,05$ .

## Referencias

1. Tang D. C., Zhang J., Toro H., Shi Z., Van Kampen K. R. (2009) "Adenovirus as a carrier for the development of influenza virus-free avian influenza vaccines". *Expert Rev Vaccines* 8: 469-481.
2. Neumann G., Watanabe T., Ito H., Watanabe S., Goto H., *et al.* (1999) "Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs". *Proc. Natl. Acad. Sci.*, EE.UU. 96: 9345-9350.
3. Wei C. J., Boyington J. C., McTamney P. M., Kong W. P., Pearce M. B., *et al.* (2010) "Induction of broadly neutralizing H1N1 influenza antibodies by vaccination". *Science* 329: 1060-1064.4.
4. König R., Stertz S., Zhou Y., Inoue A., Hoffmann H. H., *et al.* (2010) "Human host factors required for influenza virus replication". *Nature* 463: 813-817.
5. Poland G. A., Jacobson R. M., Ovsyannikova I. G. (2009) "Influenza virus resistance to antiviral agents: a plea for rational use". *Clin Infect Dis* 48: 1254-1256.
6. Hartman Z. C., Appledorn D. M., Amalfitano A. (2008) "Adenovirus vector induced innate immune responses: impact upon efficacy and toxicity in gene therapy and vaccine applications". *Virus Res* 132: 1-14.
7. Yamaguchi T., Kawabata K., Kouyama E., Ishii K. J., Katayama K., *et al.* (2010) "Induction of type I interferon by adenovirus-encoded small RNAs". *Proc Natl Acad Sci EE.UU.*, 107: 17286-17291.
8. Thiele A. T., Sumpter T. L., Walker J. A., Xu Q., Chang C. H., *et al.* (2006) "Pulmonary immunity to viral infection: adenovirus infection of lung dendritic cells renders T cells nonresponsive to interleukin-2". *J Virol* 80: 1826-1836.
9. Zhu J., Huang X., Yang Y. (2008) "A critical role for type I IFN-dependent NK cell activation in innate immune elimination of adenoviral vectors in vivo". *Mol Ther* 16: 1300-1307.
10. Higashimoto Y., Yamagata Y., Itoh H. (2006) "Complex effect of adenovirus early region proteins on innate immune system". *Inflamm Allergy Drug Targets* 5: 229-237.
11. Schaack J., Bennett M. L., Colbert J. D., Torres A. V., Clayton G. H., *et al.* (2004) "E1A and E1B proteins inhibit inflammation induced by adenovirus". *Proc Natl Acad Sci*, EE.UU. 101: 3124-3129.
12. Rhee E. G., Blattman J. N., Kasturi S. P., Kelley R. P., Kaufman D. R., *et al.* (2011) "Multiple innate immune pathways contribute to the immunogenicity of recombinant adenovirus vaccine vectors". *J Virol* 85: 315-323.
13. Goodman A. G., Zeng H., Proll S. C., Peng X., Cilloniz C., *et al.* (2010) "The alpha/beta interferon receptor provides protection against influenza virus replication but is dispensable for inflammatory response signaling". *J Virol* 84: 2027-2037.
14. Tumpey T. M., Szretter K. J., Van Hoeven N., Katz J. M., Kochs G., *et al.* (2007) "The M31 gene protects mice against the pandemic 1918 and highly lethal human H5N1 influenza viruses". *J Virol* 81: 10818-10821.
15. Croyle M. A., Patel A., Tran K. N., Gray M., Zhang Y., *et al.* (2008) "Nasal delivery of an adenovirus-based vaccine bypasses pre-existing immunity to the vaccine carrier and improves the immune response in mice". *PLoS ONE* 3: e3548.
16. Song K., Bolton D. L., Wilson R. L., Camp J. V., Bao S., *et al.* (2010) "Genetic immunization in the lung induces potent local and systemic immune responses". *Proc Natl Acad Sci*, EE.UU., 107: 22213-22218.
17. Van Kampen K. R., Shi Z., Gao P., Zhang J., Foster K. W., *et al.* (2005) "Safety and immunogenicity of adenovirusvectored nasal and epicutaneous influenza vaccines in humans". *Vaccine* 23: 1029-1036.
18. Tuvim M. J., Evans S. E., Clement C. G., Dickey B. F., Gilbert B. E. (2009) "Augmented lung inflammation

protects against influenza A pneumonia". *PLoS ONE* 4: e4176.

19. Norton E. B., Clements J. D., Voss T. G., Ca'rdenas-Freytag L. (2010) "Prophylactic administration of bacterially derived immunomodulators, improves the outcome of influenza virus infection in a murine model". *J. Virol.* 84: 2983-2995.

20. Couch R. B. (2004) "Nasal vaccination, Escherichia coli enterotoxin, and Bell's palsy". *N. Engl. J. Med* 350: 860-861.

21. Takahashi E., Kataoka K., Fujii K., Chida J., Mizuno D., *et al.* (2010) "Attenuation of inducible respiratory immune responses by oseltamivir treatment in mice infected with influenza". *A virus. Microbes Infect* 12: 778-783.

22. Wang J., Thorson L., Stokes R. W., Santosuosso M., Huygen K., *et al.* (2004) "Single mucosal, but not parenteral, immunization with recombinant adenoviral-based vaccine provides potent protection from pulmonary tuberculosis". *J Immunol* 173: 6357-6365.

23. Lemiale F., Kong W. P., Akyurek L. M., Ling X., Huang Y., *et al.* (2003) "Enhanced mucosal immunoglobulin A response of intranasal adenoviral vector human immunodeficiency virus vaccine and localization in the central nervous system". *J Virol* 77: 10078-10087.

24. Hoelscher M. A., Garg S., Bangari D. S., Belser J. A., Lu X., *et al.* (2006) "Development of adenoviral-vector-based pandemic influenza vaccine against antigenically distinct human H5N1 strains in mice". *Lancet* 367: 475-481.

25. Price G. E., Soboleski M. R., Lo C. Y., Misplon J. A., Quirion M. R., *et al.* (2010) "Single dose mucosal immunization with a candidate universal influenza vaccine provides rapid protection from virulent H5N1, H3N2 and H1N1 viruses". *PLoS ONE* 5: e13162.

26. Clements M. L., Betts R. F., Tierney E. L., Murphy B. R. (1986) "Serum and nasal wash antibodies associated with resistance to experimental challenge with influenza A wild-type virus". *J Clin Microbiol* 24: 157-160.

27. Shi Z., Zeng M., Yang G., Siegel F., Cain L. J., *et al.* (2001) "Protection against tetanus by needle-free inoculation of adenovirus-vectored nasal and epicutaneous vaccines". *J Virol* 75: 11474-11482.

28. Evans R. K., Nawrocki D. K., Isopi L. A., Williams D. M., Casimiro D. R., *et al.* (2004) "Development of stable liquid formulations for adenovirus-based vaccines". *J Pharm Sci* 93: 2458-2475.

29. Lynn D. E. (2001) "Effects of temperature on the susceptibility of insect cells to infection by baculoviruses". *Methods Cell Sci* 23: 221-225.

30. Gaush C. R., Smith T. F. (1968) "Replication and plaque assay of influenza virus in an established line of canine kidney cells". *Appl Microbiol* 16: 588-594.

31. Ilyushina N. A., Khalenkov A. M., Seiler J. P., Forrest H. L., Bovin N. V., *et al.* (2010) "Adaptation of pandemic H1N1 influenza viruses in mice". *J Virol* 84: 8607-8616.

32. Barnard D. L., Wong M. H., Bailey K., Day C. W., Sidwell R. W., *et al.* (2007) "Effect of oral gavage treatment with ZnAL42 and other metallo-ion formulations on influenza A H5N1 and H1N1 virus infections in mice". *Antivir Chem Chemother* 18: 125-132.

*Ejemplo 3: Dúo de vacuna-fármaco vectorizado con adenovirus como posible impulsor de la conferencia de protección en masa contra enfermedades infecciosas*

El poder de combate contra la enfermedad de las vacunas ha sido una bonanza para la salud pública acreditada con la reducción a nivel mundial de la mortalidad y la morbilidad. El objetivo de amplificar aún más el poder mediante la cobertura de las vacunas de refuerzo requiere el desarrollo de una nueva generación de vacunas de respuesta rápida que puede producirse en masa a bajo coste y administrarse en masa por personal no médico. Las nuevas vacunas también deben estar dotadas de un mayor margen de seguridad que el de las vacunas convencionales. La vacuna no replicante vectorizada con adenovirus promete aumentar la cobertura de la vacuna, porque el vector se puede fabricar rápidamente en células en suspensión sin suero en respuesta a un aumento de la demanda y administrarse de forma no invasiva mediante pulverización nasal en sujetos humanos de acuerdo con la medicina evolutiva. En contraste con la inyección parenteral, la vacunación no invasiva de la mucosa reduce al mínimo la inflamación sistémica. Además, la inmunidad hacia el adenovirus preexistente no interfiere apreciablemente con la potencia de una vacuna nasal vectorizada con adenovirus. La administración nasal de vectores de adenovirus que codifican antígenos patógenos no solo da menos miedo y es indolora, sino que también confiere una protección rápida y sostenida contra los patógenos mucosales como un dúo de fármaco-vacuna, ya que las partículas de adenovirus solas sin expresión transgénica pueden inducir un estado antigripal en las vías respiratorias. Además de la vacunación humana, los animales también pueden inmunizarse en masa mediante esta clase de vacunas vectorizadas.

Letanía de demandas de mejores vacunas. Aunque la vacunación resulta ser el método más rentable para la prevención de enfermedades, una ofensiva radical para aumentar la cobertura de la vacuna sigue siendo un objetivo importante en el movimiento hacia una mejor salud pública en todo el mundo. Las vacunas actuales que han sido autorizadas para su comercialización incluyen microorganismos enteros muertos, microorganismos vivos atenuados, extractos microbianos, proteínas purificadas o recombinantes, vacunas de ADN y partículas similares a los virus. Aunque muchas enfermedades han sido derrotadas por la amplia distribución de estas vacunas, el objetivo de generar inmunidad comunitaria (colectiva) en una amplia variedad de entornos de enfermedades sigue siendo elusivo debido a una serie de problemas en los programas de vacunación actuales. En concreto, los efectos secundarios adversos asociados a la vacuna varían desde la respuesta inflamatoria local y sistémica, la fiebre, la activación plaquetaria, la disfunción autónoma cardíaca, la reacción anafiláctica (inducida por la inyección de aguja

de ciertas vacunas) [1-4] a la rara aparición de poliomielitis paralítica (mediada por la ingestión de la vacuna oral contra la polio) [5], miopericarditis (inducida por la inoculación de la vacuna de la viruela Dryvax) [6] y la parálisis de Bell (inducida por un adyuvante nasal de toxina bacteriana) [7,8]. En 2010, se notificó un aumento repentino de la narcolepsia entre los vacunados en unos cuantos países tras la inyección con aguja de una vacuna contra la gripe pandémica H1N1 que contenía adyuvante de escualeno [201]. La inyección de escualeno solo puede inducir artritis reumatoide en animales [9]. A medida que van surgiendo pruebas se demuestra que la inflamación crónica de bajo grado se asocia con enfermedades cardiovasculares [10], obesidad [11], diabetes [11], cáncer [12] y trastorno neurológico [13], la inflamación inducida por la vacuna ahora necesita ser el centro de atención. Si una reacción inflamatoria aguda inducida por la inyección de un complejo de adyuvante-vacuna inmunoestimulante [1-3] podría convertirse en una inflamación crónica de bajo grado y desencadenar cualquiera de estas dolencias en un subconjunto de vacunados a lo largo del tiempo es de suma importancia en la sanidad pública; sin embargo, este riesgo potencial no ha sido investigado con rigor. Dado que el concepto de seguridad de las vacunas está evolucionando desde la "protección contra enfermedades inducidas por patógenos" a "ninguna posibilidad de inducir consecuencias adversas", no se permitiría ningún agente foráneo conocido, toxicidad ni virulencia residual en una vacuna, y se deben evitar cualquier posibilidad de inducción de efectos secundarios desconocidos (por ejemplo, inflamación en órganos vitales).

Las respuestas inmunes mucosas y sistémicas son provocadas y reguladas con un considerable grado de independencia, y la mayoría de las vacunas se han administrado de manera invasiva mediante inyección intramuscular, lo que induce una buena inmunidad sistémica, pero a menudo una inmunidad mucosa débil que es crucial para la defensa contra los patógenos de la mucosa (por ejemplo, Virus de la gripe, *Mycobacterium tuberculosis* y VIH) [14,15]. La inducción eficiente de la inmunidad mucosa suele emplear la vacunación nasal u oral debido a la capacidad única de las células dendríticas (DC) de la mucosa residentes para inducir el cambio de IgA y para imprimir receptores de asentamiento específico de la mucosa (por ejemplo, CCR9 e integrina 4β7) en linfocitos [15,16]. Además de la débil inmunidad de la mucosa inducida por una vacuna inyectable, la aguja de la jeringa como un dispositivo de administración de vacunas también plantea problemas graves a través de la reutilización en condiciones no estériles intencionada o no intencionadamente, lesiones por pinchazos de aguja, eliminación inadecuada de desechos, así como un servicio limitado de inyección por el personal médico autorizado durante una crisis [17]. El temor generalizado a las agujas (aicmofobia) desempeña otro papel en la obstaculización de la cobertura de las vacunas. Por lo tanto, algunas personas prefieren arriesgarse a contraer una enfermedad frente a las probabilidades de padecer dolor, lesiones o muerte por vacunación sistémica. Dado que el objetivo de los programas de vacunación es reducir la probabilidad general de infección mediante la generación de inmunidad comunitaria (colectiva), la misión se verá perjudicada por una suspensión de la vacunación debido al miedo generalizado a los riesgos. Hasta la fecha, están surgiendo en el horizonte tecnologías que permiten revertir las percepciones negativas mediante el desarrollo de una nueva generación de vacunas de respuesta rápida que sean seguras, eficaces, indoloras y económicas.

Vacunación no invasiva como medio para aumentar la cobertura de la vacuna. La vacunación no invasiva sin aguja promete cambiar la actitud del público de "verse obligado a pincharse" a "buscar de forma proactiva la vacunación sin miedo". Las vacunas pueden administrarse de forma no invasiva por ingestión oral [5], pulverización nasal [18,19], así como la aplicación tópica de un parche cutáneo [19-23] de manera indolora. La vacunación no invasiva mediante la administración de vacunas en la superficie de contacto entre el cuerpo interno y el entorno externo no solo confiere un alto grado de comodidad para los vacunados, sino que también puede conducir a una respuesta inmune cualitativamente superior en comparación con la vacunación sistémica convencional. Las superficies mucocutáneas están cubiertas por un epitelio altamente inmunocompetente que sirve como una barrera física y garantiza que los antígenos que penetran en la capa superficial se capturan de manera eficaz y se presentan al sistema inmunitario. Por lógica, los animales y los seres humanos deben desplegar las células inmunes más competentes a lo largo de la barrera superficial para evitar las infecciones, ya que sería contraproducente mantener a estos "soldados inmunes profesionales" en los tejidos profundos donde rara vez se encuentran con patógenos invasores. Las células presentadoras de antígenos profesionales (APC), que incluyen múltiples subconjuntos de DC [24,25], células gdT [26] y otras, se pueden encontrar en altas densidades a lo largo de la superficie mucocutánea. Un subconjunto de células de médula ósea de ratón que expresan la enzima sintetizante de ácido retinoico es capaz de proporcionar ácido retinoico a los precursores de DC para inducir funciones mucosas de DC, incluyendo la generación de linfocitos T reguladores de Foxp3+, linfocitos B secretores de IgA y receptores de asentamiento específicos de la mucosa [27]. Se ha demostrado que la vía de la vacunación afecta críticamente no solo a la magnitud, sino también el fenotipo y al tráfico de los linfocitos T CD8+ específicos del antígeno en ratones. La inyección intramuscular de una vacuna inducida por adenovirus (Ad) indujo una expresión transgénica local robusta y generó linfocitos T CD8+ de alta frecuencia y polifuncionales que se desplazaron ampliamente a los compartimentos tanto sistémico como mucoso. Por el contrario, la instilación intranasal de la vacuna vectorizada con Ad condujo a una expresión transgénica local igualmente robusta, pero generó linfocitos T CD8+ monofuncionales de baja frecuencia con patrones de tráfico anatómico restringidos [28]. La vacunación no invasiva aprovecha, de este modo, una vía biológica existente que aprovecha la capacidad del sistema inmune para responder a sitios de tejidos superficiales pero inmunocompetentes a lo largo de la superficie mucocutánea para generar inmunidad protectora localizada contra los patógenos de la mucosa en la entrada sin inducir una respuesta inmune sistémica excesivamente reactiva.

Aunque se requiere para la fabricación aséptica de vacunas según las buenas prácticas de fabricación actuales, aún puede producirse contaminación por microorganismos desconocidos o contaminación por debajo de la detección con instrumentos modernos y ensayos de alto rendimiento. La administración conjunta de estos contaminantes con una vacuna no invasiva en la superficie mucocutánea presentaría poco peligro para el vacunado, ya que el sistema inmunitario mucocutáneo está bien versado en contrarrestar la invasión microbiana en todo momento, ya que la superficie de contacto está en contacto constante con los microbios. Por el contrario, la inyección de una vacuna contaminada en los tejidos profundos puede, en teoría, desencadenar un crecimiento exponencial de microorganismos dentro del cuerpo en ausencia de una respuesta inmune oportuna o, a la inversa, una "tormenta inmune" inducida por un sistema inmune que sobrereactúe. En general, la generación de la inmunidad protectora a lo largo de la superficie mucocutánea es una rutina diaria; los animales y los seres humanos han desarrollado mecanismos adecuados para ganar batallas diarias (invasión microbiana diaria) sin perder la guerra (salud global). La vacunación no invasiva utiliza el funcionamiento diario del sistema inmune a lo largo de la superficie de contacto sin sorprender al sistema inmune mediante la administración física de complejos de vacuna-adyuvante inmunoestimulantes en tejidos profundos donde la inmunocompetencia es baja.

Vía en zigzag para desarrollar un adenovirus en un vehículo vacunal. El adenovirus pertenece a una familia de virus de ADN icosaédricos no desarrollados con un genoma de ADN lineal de 30-38 kb (el tamaño varía de un grupo a otro) precedido y seguido por repeticiones terminales invertidas. Una partícula de Ad contiene un genoma de ADN estrechamente enrollado empaquetado dentro de una cápside de proteína hexagonal (FIG. 9A). El genoma de Ad contiene tanto genes tempranos que codifican proteínas reguladoras como genes tardíos que codifican proteínas estructurales [29]. Varios serotipos de Ad se encuentran comúnmente en animales y seres humanos, y puede haber diferencias significativas en la patogenicidad y el curso de la enfermedad entre los diferentes serotipos; algunos son bastante benignos en hospedadores humanos inmunocompetentes (por ejemplo, serotipo 5 de Ad humano [30]), mientras que otros pueden causar enfermedades que suelen ser leves y autolimitantes. Una serie de razones notables justifican el desarrollo de un Ad en un vehículo vacunal. En concreto, las vacunas orales basadas en Ad4 y Ad7 humanos (un tipo de vacuna no invasiva) han demostrado ser seguras y eficaces durante la inmunización masiva de reclutas militares [31]. Potencialmente, la replicación de Ad4 o Ad7 se puede obtener mediante bioingeniería adicional en vehículos vacunales orales para generar inmunidad contra otros antígenos derivados de patógenos. Sin embargo, es difícil liberar cuantitativamente un vector replicante obtenido mediante bioingeniería que represente un organismo genéticamente modificado de manera controlada. La introducción de un organismo genéticamente modificado en el ecosistema también es indeseable en la percepción del público. Un vector no replicante sería, por tanto, más seguro y más aceptable que su homólogo replicante. Aunque se desarrolló un vector Ad5 no replicante hace casi tres décadas mediante el truncamiento de su región E1 (FIG. 9) [32], un problema crítico para el vector Ad5 defectuoso en E1 ( $\Delta E1$ ) producido en células 293 humanas es la contaminación intrínseca Ad competente en la replicación (RCA) que surge a través de la recombinación homóloga entre secuencias solapantes que enmarcan el locus E1 mostrado por las células 293 transfectadas y la cadena principal del vector [33]. RCA representa un riesgo biológico, porque puede replicarse en un hospedador infectado con la capacidad de transmisión horizontal a los espectadores a través de la supresión vírica [30]. Para sortear el problema del RCA, se han generado vectores de Ad libres de RCA en células PER.C6 humanas usando vectores lanzadera compatibles con PER.C6 que no contienen secuencias solapantes con el genoma de PER.C6 [34,35]. A diferencia de Ad4 y Ad7 replicantes, el Ad5 no replicante no inmuniza a los animales de manera eficaz cuando se administran por vía oral debido a su incapacidad para experimentar la amplificación del virus y su susceptibilidad a pH bajo, proteasas gástricas y pancreáticas y mucinas extracelulares [36].

A pesar de los problemas observados tras la administración por vía oral, se ha desarrollado el Ad5 defectuoso en E1/E3 ( $\Delta E1E3$ ) no replicante (FIG. 9) y se ha usado como un vector de terapia génica parenteral en una gran cantidad de ensayos terapéuticos debido a su alta capacidad para acomodar los transgenes, la producción de alto título, la administración de genes de alta eficiencia y la expresión transgénica de alto nivel (al menos como un estallido inicial) [35]. Sin embargo, Ad5 no es un vector ideal para la terapia génica clásica, porque la expresión transgénica es transitoria [35]. Por lo tanto, el uso de un vector de Ad5 no cumple con un objetivo principal de la terapia génica, que, en general, requiere una expresión transgénica sostenida. Por otra parte, la presencia común de la inmunidad hacia el Ad5 preexistente en poblaciones humanas [37-39] y el rápido desarrollo de una respuesta inmune anti-Ad5 tras la primera inoculación con el vector [40,41] han impedido su uso clínico limitando las eficacias de las transferencias génicas. Las estrategias para eludir estos inconvenientes incluyen el cambio de serotipo, la modificación de la cápside y el desarrollo de vectores Ad no humanos, bajo la suposición de que otro vector Ad puede sustituirse cuando el inicial es deshabilitado por la inmunidad hacia el Ad preexistente. Aunque se han diseñado por bioingeniería el Ad3 humano, Ad4, Ad35, Ad41 o un Ad5 quimérico que contiene las fibras de Ad11 o Ad35 en vectores de Ad no replicantes (FIG. 10), el Ad5 es incluso más potente y más seguro que otros serotipos en los modelos animales preclínicos [42]. También se ha desarrollado una serie de Ad no humanos tales como el Ad bovino [43], Ad porcino [43] y Ad de primate no humano [44] para ampliar el repertorio de vectores de Ad (FIG. 10). A pesar de que una vacuna vectorizada con Ad porcino puede ser al menos tan potente como su homólogo de Ad5 en ratones [45], el Ad5 humano sigue siendo el principal vector de transferencia de genes debido al riesgo de inducir dolencias humanas impredecibles del Ad no humano [46]. El genoma del Ad5 humano es notablemente estable en el campo incluso tras la coinfección con otros serotipos de Ad [47]. Además, el vector de Ad5 se ha desarrollado aún más para mostrar antígenos foráneos en la superficie tras la fusión de epítopos patógenos al pIX [48] o a las proteínas de la cápside del hexón [49], además de codificar antígenos patógenos en su genoma de ADN (FIG. 10).

Se desarrollaron vectores de Ad5 menos inmunogénicos mediante eliminación de E2b [50, 51] o casi todas las secuencias de Ad5, excepto las repeticiones terminales invertidas y la señal de empaquetamiento (Ad cobarde) (FIG. 10) [52]. Hasta la fecha, estas sofisticadas estrategias aún no han producido una profunda mejora clínica.

5 En contraste con la inyección intramuscular o intravenosa de Ad5, se ha demostrado que la administración intranasal (la vía natural de la infección por Ad5) permitiría que una vacuna vectorizada con Ad5  $\Delta E1E3$  evitara la inmunidad hacia el Ad5 preexistente sin perder significativamente la potencia en ratones [41,53], primates no humanos [54] y seres humanos [19]. Es probable que estas observaciones se atribuyan a la alta eficacia de la administración génica, a la expresión robusta de los transgenes y a la presentación potente de antígenos a lo largo de la barrera de la mucosa en el tracto respiratorio. La inmunidad anti-Ad5, por lo tanto, ya no es un factor limitante insuperable, y el perfeccionamiento de los vectores de Ad obtenidos por bioingeniería puede no ser ya una condición sine qua non para el desarrollo adicional de vacunas vectorizadas con Ad.

15 La reputación del vector de Ad5 se descarriló varias veces durante su desarrollo. Además de la inmunidad hacia el Ad5 preexistente, la muerte de un paciente con deficiencia parcial de ornitina transcarbamilasa (OTC) tras infundir una dosis alta de vector de Ad5-OTC en su arteria hepática durante un ensayo de terapia génica en seres humanos [55] marcó al Ad5 como un vector peligroso a percepción del público en general. Las pruebas muestran que la inyección de partículas de Ad en el sistema circulatorio (una vía no natural para la infección de Ad) es un enfoque inseguro, porque las partículas de Ad inducen rápidamente la inflamación sistémica después de la inyección [56,57], y una variedad de serotipos de Ad causa la activación de la coagulación, posiblemente a través de la interacción con las plaquetas [42]. Durante un ensayo humano a gran escala (estudio STEP) de una vacuna contra el VIH vectorizada con Ad5, la administración por inyección intramuscular no disminuyó la carga vírica del VIH, y la vacunación se asoció con un mayor riesgo de infección humana por VIH en sujetos Ad5 seropositivos [58,59]. Los resultados no intuitivos pueden atribuirse nuevamente al uso indebido del vector, ya que la potencia de una vacuna vectorizada con Ad5 sobrepasa la de otras plataformas de vacunas basadas en virus y no virus para generar inmunidad celular [60]; por consiguiente, la expansión inducida por Ad5 de los linfocitos T CD4+ agravaría esta enfermedad peculiar ya que los linfocitos T CD4+ son las dianas específicas para la infección por VIH [61]. Además, los sujetos humanos se inmunizaron mediante inyección intramuscular de partículas de Ad5 durante el estudio STEP [58,59], que no es muy potente para generar la inmunidad de la mucosa contra un patógeno de la mucosa como el VIH [14,62,63].

35 Verificación de la realidad de las vacunas actuales vectorizadas con adenovirus. Para desarrollar la próxima generación de vacunas que sean seguras y eficaces, es crucial que la vacuna genere inmunidad protectora rápidamente con una alta relación beneficio-riesgo. La fabricación, distribución y administración de la vacuna debe ser fácil, rápida y económica. Además, la estabilidad inherente de la vacuna formulada y el producto relleno final debe permitir el almacenamiento a largo plazo sin una cadena de frío.

40 Como se muestra en la Tabla 2, se ha generado inmunidad protectora contra una amplia variedad de patógenos en ratones, cobayas, pollos, hámsteres, ratas alodoneras, mapaches, mofetas, cerdos y primates no humanos tras la inmunización con vacunas vectorizadas con Ad. En general, las vacunas vectorizadas con Ad pueden conferir una protección rápida y más sólida contra patógenos vivos que otros tipos de vacunas en modelos animales.

45 Aunque se han realizado múltiples ensayos clínicos en seres humanos de vacunas vectorizadas con Ad, pocos sujetos humanos inmunizados han sido expuestos a un patógeno vivo virulento (Tabla 3). En particular, se protegió un subconjunto de voluntarios humanos inmunizados mediante inyección intramuscular de ADN y vacunas de la malaria vectorizadas con Ad5 (estimulación con ADN/refuerzo con Ad5) contra la exposición al esporozoito de la malaria viva tras la alimentación de mosquitos en sujetos humanos Ad5 seronegativos. Se ha demostrado que la vacunación de ADN sola sin refuerzo de Ad5 no protegió a los seres humanos contra la malaria; aún está por verse si la vacunación con Ad5 por sí sola podría conferir protección [64]. Aunque los seres humanos inmunizados no fueron expuestos a patógenos vivos durante la mayoría de los ensayos en seres humanos (Tabla 3), han proporcionado una amplia base de datos de seguridad para el uso de vectores de Ad en seres humanos

55 Potencia y la seguridad de las vacunas nasales vectorizadas con adenovirus. Como se ha descrito anteriormente, la vacunación nasal induce una potente inmunidad mucosa sin el uso de agujas. Las DC del tracto respiratorio forman una red subepitelial contigua dentro del tracto nasoespiratorio, uniendo la inmunidad innata y adquirida. La densidad de las DC dentro del tracto respiratorio es más alta en aquellas zonas expuestas a mayores cantidades de antígeno inhalado [65]. El tejido linfoide asociado a la nasofaringe, que constituye el anillo de Waldeyer en seres humanos, es un sitio inductivo único para las respuestas de los linfocitos B y la generación de células plasmáticas. La vacunación nasal es, por lo tanto, un motor para la generación de inmunidad humoral, incluyendo la formación de un anticuerpo IgA secretor dentro del tracto respiratorio [66]. Se han inducido respuestas inmunes humorales locales en secreciones nasales, vaginales y salivales tras la administración intranasal de vacunas vectorizadas con Ad en primates no humanos [67]. Una vacuna nasal vectorizada con Ad5 indujo mayores respuestas de IgA específicas del antígeno en las secreciones mucosas y los sueros en ratones que su homólogo inyectable [68]. Además de la inmunidad humoral, se observaron respuestas inmunes celulares en los compartimientos inmunes sistémicos y de la mucosa poco después de inmunizar ratones con una vacuna contra el herpes vectorizada con Ad independientemente de la vía de inoculación; sin embargo, las respuestas anamnésicas de los linfocitos T

citotóxicos se limitaron exclusivamente a los tejidos linfoides mucosales o sistémicos tras la inmunización mucosa o sistémica, respectivamente, varios meses después de la inmunización [14].

5 Aunque la vacuna de la malaria estimulada con ADN/reforzada con Ad5 indujo protección contra la exposición a esporozoítos vivos de la malaria en sujetos humanos Ad5 seronegativos, la falta de protección de cinco voluntarios humanos Ad5 seropositivos [64] puede atribuirse a la inmunidad hacia el Ad5 preexistente [37,38,40,41]. Como se ha descrito anteriormente, un enfoque para sortear este obstáculo es inocular vacunas vectorizadas con Ad mediante administración nasal, lo que transforma lo que es una desventaja para las vacunas inyectables en una ventaja para las vacunas mucosas no invasivas sin una reducción de la eficacia de la posterior readministración de Ad5 [19, 41, 53,54]. Una vacuna nasal vectorizada con Ad5 puede inducir inmunidad mucosa focalizada en las vías respiratorias, como lo demuestran los hallazgos de que la inmunización intranasal, pero no la inmunización sistémica, induce linfocitos T citotóxicos de larga vida en los tejidos de la mucosa [14]. Además, las vacunas nasales vectorizadas con Ad5 pueden proteger a los animales contra los patógenos de las mucosas cuando falla la inmunización sistémica, aunque esta última induce una respuesta inmune sistémica más sólida [63,69,70]. La hipótesis de que la respuesta inmune enfocada en la mucosa inducida por la vacunación nasal puede reducir en gran medida la carga sistémica (por ejemplo, la inflamación sistémica) a los tejidos y órganos internos no afectados fue corroborada por el hallazgo de que las CD 103+ de la mucosa pueden amortiguar las respuestas inflamatorias al fomentar la conversión de los linfocitos T sin tratamiento previo en linfocitos T reguladores Foxp3+ [71].

20 Los efectos adversos comunes inducidos por las partículas de Ad administradas sistémicamente son el daño hepático y la toxicidad sistémica debida al secuestro de partículas de Ad hacia el hígado en grandes cantidades tras la inyección [72]. En contraste con la inyección parenteral, la biodistribución de Ad se limita al pulmón después de la administración intranasal [73] sin que se observe inflamación en ninguno de los órganos internos [68].

25 Debido a la proximidad de la cavidad nasal con el cerebro, es crucial determinar si las partículas de Ad5 pueden inducir inflamación y toxicidad en el cerebro tras la pulverización nasal. A diferencia de la gripe, que está asociada con trastornos neurológicos humanos [74], no se ha informado que la infección natural por Ad5 induzca encefalitis en seres humanos. La administración intranasal de los vectores de Ad5  $\Delta E1E3$  en ratones no medió la expresión de transgenes más allá del bulbo olfatorio ni la inducción de inflamación en el cerebro [68]. Por lo tanto, es concebible que no se puedan introducir cantidades significativas de Ad5 en el cerebro tras la administración nasal. Aunque, en ocasiones, una pequeña cantidad de partículas de Ad5 puede infiltrarse en el cerebro, es probable que el Ad5 no replicante haga menos daño que su homólogo replicante de tipo silvestre debido a su incapacidad para amplificar los efectos adversos a través de la replicación y la expresión génica tardía. El perfil de seguridad de la vacuna contra el virus de la gripe vivo atenuado (LAIV, conocido como FluMist® en EE. UU.) [75] corrobora la hipótesis de que la encefalitis inducida por el virus de la gripe [74] podría atribuirse a la replicación vírica en el cerebro, ya que el LAIV solo puede replicarse en las vías respiratorias, donde la temperatura es más baja, pero no dentro del cerebro, donde hace demasiado calor para el LAIV adaptado al frío. La inducción de la encefalitis por el virus del herpes simple en pacientes con deficiencia en TLR-3 [76] sugiere que puede ser un hecho común que una pequeña cantidad de virus penetre en el cerebro a través del tracto olfatorio y que exista un mecanismo de defensa eficaz en las personas inmunocompetentes para detener el virus antes de que se replique de manera incontrolada dentro del cerebro. Debido a que la infección natural mediante la replicación del Ad5 de tipo silvestre no está asociada con la encefalitis, la pulverización nasal del vector de Ad5 no replicante representa, por lo tanto, un motor en la búsqueda de un vehículo seguro para la administración de vacunas.

45 Aunque puede haber sido un error inmunizar a los seres humanos mediante la inyección intramuscular de una vacuna del VIH vectorizada con Ad5 [58,59], la capacidad de Ad5 para movilizar el repertorio de linfocitos T CD4+ puede ser el impulsor, en parte, de la generación de una potente inmunidad protectora contra otros patógenos [41, 53, 63, 77-79]. Hasta la fecha, la administración intranasal de una vacuna de la gripe vectorizada con Ad5 ha inducido la seroconversión en sujetos humanos sin causar efectos secundarios graves en presencia de inmunidad hacia el Ad5 preexistente [19]. La inducción de la inmunidad estéril contra la malaria [64] y la seroconversión contra la gripe [19] en seres humanos (Tabla 2) junto con la inmunidad protectora sólida inducida en múltiples modelos animales (Tabla 2) demuestran colectivamente el valor de las vacunas vectorizadas con Ad en la prevención de enfermedades.

55 La LAIV ha sido autorizada para inmunizar un subconjunto de poblaciones humanas (2-49 años de edad en EE. UU.) [75]. Al igual que LAIV, es posible que una vacuna nasal vectorizada con Ad no pueda inmunizar a los jóvenes y ancianos, al menos durante el período inicial, antes de que su perfil de seguridad esté bien establecido a través de ensayos de campo a gran escala. Además, la vacunación nasal no se recomendaría para las personas con enfermedades respiratorias (por ejemplo, asmáticas). Queda por verse si las mujeres embarazadas serán susceptibles a la vacunación nasal con partículas de Ad no replicantes.

60 Perspectiva para la comercialización de vacunas vectorizadas con Ad y otras vacunas basadas en ADN recombinantes. La vacuna vectorizada con Ad5  $\Delta E1E3$  no replicante sin contaminación de RCA [35] puede clasificarse como una variante de las vacunas de ADN, porque consiste en un genoma de ADN lineal embebido en una cápside de proteínas (FIG. 9) sin capacidad de replicación en células no permisivas. A diferencia de las vacunas de ADN desnudo que deben ser inoculadas por personal capacitado usando un dispositivo de penetración como la

pistola de genes [80,81], aguja de jeringa [82] o electroporador [83], las partículas de Ad pueden penetrar de forma autónoma a lo largo de la barrera mucosa tras la administración nasal [35]. Hace solo una década, las vacunas de ADN eran una novedad no demostrada con aceptación limitada en la comunidad científica, a pesar de que las vacunas de ADN carecen de muchos de los posibles problemas de seguridad en comparación con las vacunas contemporáneas y de que la tecnología de ADN recombinante puede generar nuevas vacunas rápida y creativamente a bajo coste [80, 82]. Hasta la fecha, se han autorizado cuatro vacunas de ADN desnudo para uso animal a escala comercial [84]. Se ha autorizado un vector de Ad5 contaminado con RCA que codifica p53 producido en células 293 para tratar a un gran número de pacientes con cáncer en China desde 2004 [85]. A medida que el cuadro clínico comienza a desplegarse como resultado de años de mayor uso y seguimiento cuidadoso de los pacientes, es posible que los datos prometedores permitan dar paso a una era de vacunas basadas en el ADN recombinante, siendo la vacuna vectorizada con Ad una de las herramientas esenciales en el arsenal de salud pública contra las enfermedades infecciosas.

Mantenimiento de la viabilidad del vector de Ad durante el almacenamiento. Además de la seguridad y la eficacia, la próxima generación de vacunas debe ser menos dependiente de una cadena de instalaciones del frío para garantizar una amplia difusión de las vacunas a las poblaciones menos ricas del mundo. Hasta la fecha, las nuevas formulaciones han permitido que los vectores de Ad se almacenen en un tampón líquido a 4 °C durante al menos un año [86]; a 45 °C en vidrio de hidratos de carbono durante al menos 6 meses [87]; o a 4 °C durante al menos un año como polvo seco liofilizado [88]. Las tecnologías patentadas para almacenar partículas de Ad a temperatura ambiente en forma líquida o liofilizada también se han desarrollado en Stablitech [202]. En resumen, los vectores de Ad5 libres de RCA se pueden fabricar rápidamente en células en suspensión PER.C6 sin suero, purificarse fácilmente mediante cromatografía en columna y formularse como productos rellenos finales que pueden almacenarse y enviarse sin una cadena del frío (FIG. 11).

Dúo de fármaco-vacuna vectorizado con adenovirus para conferir una protección rápida y sostenida completa contra los patógenos. El solicitante demostró recientemente que la administración intranasal, pero no la inyección intramuscular de partículas de Ad5  $\Delta E1E3$ , con o sin un antígeno patógeno codificado en el genoma de Ad5, puede conferir terapia profiláctica contra la gripe antes de generarse la inmunidad adaptativa [89]. Un vector de Ad5 que codifica antígenos patógenos puede inducir así una protección rápida y sostenida completa contra un patógeno como un dúo de fármaco-vacuna (DVD). Un DVD de la gripe vectorizado con Ad5 confiere una serie de ventajas cuando se compara con las vacunas de la gripe autorizadas (Tabla 4) y los fármacos autorizados (Tabla 5). Se ha documentado que la administración de partículas de Ad5  $\Delta E1E3$  en ratones induce rápidamente la producción de una amplia selección de citocinas inflamatorias y quimiocinas [56], que incluyen el interferón de tipo I (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ) [90], deteriora las DC pulmonares [91], activa los linfocitos citolíticos naturales [92], induce la producción de óxido nítrico antiviral [57] y desencadena interacciones multifacéticas entre Ad5 y las proteínas sanguíneas, las plaquetas, los macrófagos, las células endoteliales y las respectivas células parenquimatosas [56]. Es posible que múltiples reacciones inducidas por las partículas de Ad5  $\Delta E1E3$  puedan combinarse para establecer un estado antigripal en las vías respiratorias, creando así una barrera de defensa multidimensional que no puede ser fácilmente superada por un virus de la gripe.

Aunque la terapia profiláctica contra la gripe se puede realizar mediante la administración intranasal de lisados bacterianos complejos [93] o toxinas bacterianas [94], el estado antigripal inducido por los componentes bacterianos fue muy transitorio, disminuyendo sus efectos protectores a los pocos días de la terapia [93,94]. El hallazgo de que los efectos protectores inducidos por Ad5 podrían perdurar durante al menos 3 semanas, observándose solo una reducción parcial el día 47 en una pauta de una sola dosis [89] sugiere que los mecanismos subyacentes entre los estados antigripales inducidos por componentes bacterianos y por Ad5  $\Delta E1E3$  pueden diferir. Cabe destacar que solo la terapia mediada por Ad5 permitiría un tiempo suficiente para que el componente vacunal del DVD produjera inmunidad adaptativa antes de que disminuyeran sus efectos farmacológicos (FIG. 12). Además, la administración de una toxina bacteriana asociada al tracto digestivo en el tracto respiratorio como fármaco de la gripe [94] viola un principio central en la medicina evolutiva al sorprender al sistema inmunitario, y esta pauta no natural se ha asociado con la inducción de la parálisis de Bell en sujetos humanos [7,8].

El virus de la gripe es insidioso para mutar en cepas resistentes a los fármacos cuando es inhibido por un fármaco contra la gripe (por ejemplo, el bloqueador del canal iónico M2 [amantadina, rimantadina] o el inhibidor de la neuraminidasa [oseltamivir, zanamivir]) [95]. A diferencia de los fármacos contra la influenza contemporáneos, el DVD vectorizado con Ad5 puede cambiar el hábitat en el tracto respiratorio sin afectar directamente al virus de la gripe; por lo tanto, la partícula de Ad5 no confiere presión mutacional al virus de la gripe para inducir resistencia a los fármacos. En contraste con la supresión inducida por oseltamivir de la inmunidad de la mucosa con el riesgo de aumentar la vulnerabilidad a las posteriores infecciones de patógenos de la mucosa en animales que han recibido fármaco [96], el DVD vectorizado con Ad5 mejora la inmunidad innata de la mucosa protectora, al menos en el marco de la gripe [89]. Dado que la LAIV nasal autorizado (por ejemplo, FluMist) contiene el virus de la gripe [35], la administración conjunta de LAIV con un fármaco de la gripe es contraproducente, porque el fármaco deshabilitaría la vacuna al matar a los virus de la gripe vivos. El DVD vectorizado con Ad5 no solo es compatible con un fármaco contra la gripe autorizado debido a su falta de dianas farmacológicas (por ejemplo, canal iónico o neuraminidasa) (Tabla 4), sino que también confiere terapia profiláctica como un fármaco por sí mismo, además de la capacidad de su vacuna (Tabla 5) [89].

Es poco probable que la gripe sea la única enfermedad que pueda ser detenida por las partículas de Ad5; también es poco probable que Ad5 pueda contrarrestar todas las enfermedades como una panacea. Los hallazgos simplemente demuestran que una sola administración intranasal de DVD vectorizado con Ad5 puede conferir terapia profiláctica contra al menos un subconjunto de patógenos respiratorios de la mucosa durante muchas semanas en un modelo animal preclínico, y el uso del DVD no debería ser capaz de inducir resistencia a los fármacos. La subsiguiente generación de la inmunidad protectora sostenida por el componente vacunal del DVD fortalece la eficacia. El desarrollo de una plataforma de DVD posiblemente fomentará el desarrollo de nuevas estrategias clínicas en una amplia variedad de entornos patológicos.

Inmunización masiva de animales con vacunas vectorizadas con adenovirus. Como se muestra en la Tabla 2, se han desarrollado vacunas vectoriales con Ad para inmunizar en masa a animales de granja, así como salvajes. Cabe destacar que los pollos pueden inmunizarse contra la gripe aviar (posiblemente, también otras enfermedades de las aves de corral) mediante inyección intramuscular [78], la administración *in ovo* [97-101] o pulverización mediante aerosol [102,103] de vectores de Ad5 humanos que codifican la hemaglutinina del virus de la gripe aviar. La versatilidad de las vacunas vectorizadas con Ad5 en la inmunización masiva de aves de corral es superior a la de otras vacunas avícolas. Los cerdos también se han inmunizado con éxito con vacunas vectorizadas con Ad5 [104,105]. Se ha desarrollado una vacuna oral de la rabia vectorizada con Ad canina como un cebo para inmunizar en masa a animales salvajes [106]. En general, están surgiendo vacunas vectorizadas con Ad como una herramienta prometedora en los programas de inmunización masiva.

Conclusión. Las pruebas demuestran que las vacunas vectorizadas con Ad y el nuevo DVD ofrecen un enfoque potencialmente revolucionario, lo que permite a un DVD con un diseño preciso, fácil de fabricar y altamente eficaz conferir protección rápida y sostenida a seres humanos y animales en una amplia variedad de enfermedades, sin un perfil de efectos secundarios, inestabilidad de su vida útil ni desafíos en la fabricación afrontados por otros enfoques.

Comentario de los expertos. Para impulsar aún más la cobertura de las vacunas a nivel mundial, es urgente desarrollar una nueva generación de vacunas que puedan fabricarse rápidamente a bajo coste y administrarse en masa por personal no médico sin la necesidad de una cadena del frío. Las vacunas vectorizadas con Ad5 cumplen estos criterios. El desarrollo de una plataforma de DVD puede cambiar potencialmente el panorama médico mediante la fusión de vacunas y fármacos en un solo envase que no se vea afectado por la resistencia a los fármacos.

Visión en los próximos cinco años. Se han completado dos ensayos clínicos en fase I en seres humanos de vacunas contra la gripe nasales vectorizadas con Ad5 con resultados prometedores. Se espera que la exposición de los sujetos humanos al virus de la gripe vivo tras la pulverización nasal de un DVD vectorizado con Ad5 se realice en un plazo de 5 años. Se espera la introducción de las vacunas avícolas vectorizadas con Ad5 en el mercado comercial en 5 años.

Cuestiones clave. Existe una necesidad urgente de desarrollar una nueva generación de vacunas que se puedan fabricar rápidamente y administrarse en masa por personal no médico durante una crisis. Las vacunas vectorizadas con adenovirus (Ad) 5 libres de adenovirus competentes en la replicación (RCA) pueden producirse rápidamente a bajo coste a partir de células en suspensión PER.C6 en medio libre de suero en respuesta a una escalada de la demanda. Las vacunas vectorizadas con Ad5 sin RCA pueden administrarse en masa a las personas mediante pulverización nasal, así como a las aves de corral por medio de una administración automatizada *in ovo* y pulverización mediante aerosol. Se pueden inmunizar en masa animales silvestres mediante cebos que contienen vacunas orales vectorizadas con Ad caninas. Las vacunas vectorizadas con Ad pueden inducir intervenciones inmunes altamente específicas basadas en antígenos bien definidos que son el foco de la reactividad inmune específica. No debe haber ningún problema de seguridad para la administración nasal de un vector de Ad5 sin RCA en las personas, ya que el vector no es replicante y el procedimiento cumple con la medicina evolutiva. No debería haber problemas de seguridad para la inmunización en masa de aves de corral mediante un vector de Ad5, ya que las células de pollo no son compatibles con la replicación del Ad5 humano. Es posible que los pollos eliminen rápidamente el Ad5 tras la movilización del repertorio inmune hacia una protección inmune beneficiosa después de la vacunación. Una vacuna contra la malaria estimulada con ADN/reforzada con Ad5 protegió con éxito a sujetos humanos contra la exposición a esporozoítos de la malaria vivos después de la alimentación de mosquitos. Una vacuna nasal vectorizada con Ad5 demostró, de forma fortuita, conferir una protección rápida contra la gripe de manera similar a un fármaco. El desarrollo de un dúo de fármaco-vacuna fusionando el fármaco y la vacuna en un solo envase que no se viera afectado por la resistencia a los fármacos cambiaría fundamentalmente la forma en que se preparan los fármacos y las vacunas contra la gripe. En general, se han identificado cada vez más efectos adversos inducidos por la vacunación sistémica. La inmunización no invasiva de la mucosa es más segura y eficaz para conferir protección contra patógenos en las mucosas que su homólogo sistémico.

TABLAS

**Tabla 2. Ejemplos de la inmunidad protectora inducida por vacunas vectorizadas con adenovirus contra patógenos vivos en modelos de animales**

Vacuna	Antígeno patógeno expresado a partir de Ad	Vía	Modelo animal	Exposición	Ref.
Estimulada con Ad26/reforzada con Ad35	GP del virus del Ébola	i.m.	Primate no humano	Virus del Ébola	[107]
Ad5	GP del virus del Ébola	i.m.	Primate no humano	Virus del Ébola	[108]
Ad5	GP del virus de Marburgo de Angola	i.m.	Primate no humano	Virus de Marburgo de Angola	[109]
estimulada con BCG/reforzada con Ad5	Ag85A	i.n., i.m.	Cobaya	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	[110]
Ad5	PA	i.m.	Ratón	Espora Sterne de <i>Bacillus anthracis</i>	[111]
Ad5	HA del virus H5 de la gripe aviar	i.n., i.m.	Ratón	Virus de la gripe aviar	[77,78]
estimulada con vacuna de la gripe/reforzada con Ad5	HA del virus de la gripe	i.m.	Ratón	Virus de la gripe heterosubtípica	[112]
Ad5	HA del virus H5 de la gripe aviar	i.m., <i>in ovo</i> , ocular	Pollo	Virus de la gripe aviar	[78,97,98,102]
Ad5	HA/nucleoproteína del virus de la gripe	i.m.	Cerdo	Virus de la gripe porcina	[104]
Ad5	GP/nucleocápside del hantavirus	i.m.	Hámster	Hantavirus	[113]
Ad5	Fragmento C de la neurotoxina botulínica	i.n.	Ratón	Neurotoxina botulínica	[114]
Ad5	Proteína de fusión/HA del virus del sarampión	i.n., i.m.	Rata algodónera	Virus del sarampión	[70]
Ad canino	GP del virus de la rabia	oral	Mapache, mofeta	Virus de la rabia	[106]
Ad5	Antígeno V	i.m.	Ratón	<i>Yersinia pestis</i>	[115]

Ad: Adenovirus; BCG: Bacilo Calmette-Guérin; GP: Glicoproteína; HA: Hemaglutinina; i.m.: intramuscular; i.n.: intranasal; PA: antígeno protector

5

**Tabla 3. Ejemplos ensayos clínicos en seres humanos de adenovirus y vacunas vectorizadas con adenovirus**

Vacuna	Antígeno patógeno expresado a partir de Ad	Vía	Exposición	Ref.
Ad4 y Ad7	Ninguno	Oral	Infección natural por Ad	[31]
Estimulada con ADN/reforzada con Ad5	CSP/AMA1	i.m.	Esporozoito de la malaria	[64]
Ad5	gag/pol/nef del VIH-1	i.m.	Infección natural por VIH-1	[58,59]
estimulada con ADN/reforzada con Ad5	gag/pol/env del VIH-1	i.m.	Ninguna	[203]
estimulada con Ad5/reforzada con Ad5	gag del VIH-1	i.m.	Ninguna	[203]
estimulada con Ad5/reforzada con NYVAC; estimulada con NYVAC/reforzada con Ad5	gag/pol/env/nef del VIH-1	i.m.	Ninguna	[203]

Vacuna	Antígeno patógeno expresado a partir de Ad	Vía	Exposición	Ref.
Ad5	HA del virus H1 de la gripe	i.n. y parche cutáneo	Ninguna	[203]
estimulada con Ad4/reforzada con Ad4	HA del virus H5 de la gripe aviar	Oral	Ninguna	[203]
Ad5 encapsulado y como adyuvante	HA del virus H5 de la gripe aviar	Oral	Ninguna	[203]
Ad5	85A de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	i.m.	Ninguna	[203]
estimulada con BCG/reforzada con Ad35	85A/85B/10.4 de <i>M. tuberculosis</i>	i.m.	Ninguna	[203]

Ad: Adenovirus; BCG: Bacilo Calmette-Guérin; GP: Glicoproteína; HA: Hemaglutinina; i.m.: intramuscular; i.n.: intranasal; PA: antígeno protector

**Tabla 4: Razonamiento del desarrollo de un dúo de fármaco-vacuna contra la gripe vectorizado con adenovirus de serotipo 5 a la luz de las vacunas de la gripe autorizadas**

Vacuna	Necesidad de propagar un virus de la gripe	Necesidad de usar huevos de pollo embrionados como sustrato	Velocidad de producción	Replicación tras la administración	Modo de administración	Uso concomitante con fármacos contra la gripe autorizados
TIV	Sí	Sí	Lenta	No <sup>†</sup>	Inyección con aguja	Sí <sup>†</sup>
LAIV <sup>‡</sup>	Sí	Sí	Lenta	Sí	Pulverizado nasal <sup>†</sup>	No
DVD [89]	No <sup>†</sup>	No <sup>†</sup>	Rápida <sup>†</sup>	No <sup>†</sup>	Pulverizado nasal <sup>†</sup>	Sí <sup>†</sup>

Cuando se desarrolla un DVD gripal vectorizado con adenovirus de serotipo 5 (Ad5), se pueden eliminar múltiples problemas asociados con la propagación de un virus de la gripe vivo en huevos de pollo cualificados [35].  
<sup>†</sup>Resultados deseables.  
<sup>‡</sup>Conocida como FluMist® en EE.UU., se autorizó una LAIV producida en células renales caninas de Madin Darby (MDCK) en Europa, aunque su licencia en EE.UU. no ha sido aprobada por la FDA estadounidense debido a la asociación de las células MDCK con la tumorigenicidad y la oncogenicidad [116].  
 DVD: Dúo de fármaco-vacuna, LAIV: Vacuna del virus de la gripe atenuado vivo; TIV: Vacuna del virus de la gripe inactivado trivalente.

5 **Continuación de la Tabla 4**

Redistribución con un virus gripal de tipo silvestre	Inflamación sistémica; reactividad plaquetaria; disfunción autónoma cardíaca; narcolepsia	Protección casi inmediata contra la gripe	Protección amplia contra cepas heterosubtípicas	Efectos adversos tras la administración conjunta con patógenos contaminantes no detectables
No <sup>†</sup>	Sí [2,201]	No	No	Pueden ser graves
Sí	No <sup>†</sup>	No	No	De leves a nulos <sup>†</sup>
DVD [89]	No <sup>†</sup>	No <sup>†</sup>	Rápida <sup>†</sup>	De leves a nulos <sup>†</sup>

Cuando se desarrolla un DVD gripal vectorizado con adenovirus de serotipo 5 (Ad5), se pueden eliminar múltiples problemas asociados con la propagación de un virus de la gripe vivo en huevos de pollo cualificados [35].  
<sup>†</sup>Resultados deseables.  
<sup>‡</sup>Conocida como FluMist® en EE.UU., se autorizó una LAIV producida en células renales caninas de Madin Darby (MDCK) en Europa, aunque su licencia en EE.UU. no ha sido aprobada por la FDA estadounidense debido a la asociación de las células MDCK con la tumorigenicidad y la oncogenicidad [116].  
 DVD: Dúo de fármaco-vacuna, LAIV: Vacuna del virus de la gripe atenuado vivo; TIV: Vacuna del virus de la gripe inactivado trivalente.

**Tabla 5: Razonamiento del desarrollo de un dúo de fármaco-vacuna contra la gripe vectorizado con Ad5 a la luz de las vacunas de la gripe autorizadas**

Problemas asociados	Bloqueador del canal iónico M2	Inhibidor de la neuraminidasa	Dúo de fármaco-vacuna [89]
Necesidad de administrar múltiples dosis	Sí	Sí	No <sup>†</sup>
Potencial de inducir resistencia a fármacos	Sí [95]	Sí [95]	No <sup>†</sup>
Terapia profiláctica	Sí <sup>†</sup>	Sí <sup>†</sup>	Sí <sup>†</sup>
Terapia tras la exposición	Parcial <sup>†</sup>	Parcial <sup>†</sup>	No
Regulación de la inmunidad en las mucosas	Desconocido	El Oseltamivir suprime la inmunidad en las mucosas de animales [96]	Potencia la inmunidad protectora de las mucosas [89] <sup>†</sup>
Protección sostenida durante unos cuantos meses	No	No	Sí <sup>†</sup>

<sup>†</sup>Resultados deseables.  
La principal razón de desarrollar un dúo de fármaco-vacuna (DVD) gripal vectorizado con Ad5 a la luz de los fármacos antigripales autorizados es su potencial para no ser afectado por la resistencia a fármacos, además de la conveniencia de fusionar el fármaco y la vacuna en un solo envase [89]. Cabe señalar que el desarrollo del DVD todavía está en sus primeras etapas; todavía está por verse si la terapia profiláctica se puede reproducir en sujetos humanos y si se puede desarrollar la terapia posterior a la exposición. El bloqueador del canal iónico M2 incluye amantadina y rimantadina; el inhibidor de la neuraminidasa incluye oseltamivir (Tamiflu) y zanamivir (Relenza); el DVD representa el dúo de fármaco-vacuna gripal vectorizado con Ad5 [89].

**Recursos de información**

- 5 Van Kampen K. R., Shi Z., Gao P. *et al.* "Safety and immunogenicity of adenovirus-vectored nasal and epicutaneous influenza vaccines in humans". *Vaccine* 23, 1029-1036 (2005).  
Toro H., Tang D. C., Suarez D. L., Sylte M. J., Pfeiffer J., Van Kampen K. R. "Protective avian influenza in ovo vaccination with nonreplicating human adenovirus vector". *Vaccine* 25, 2886-2891 (2007).  
10 Zhang J., Tarbet E. B., Feng T., Shi Z., Van Kampen K. R., Tang D. C. "Adenovirus-vectored drug-vaccine duo as a rapidresponse tool for conferring seamless protection against influenza". *PLoS ONE* 6, e22605 (2011).

**Referencias**

- 15 1. Salomon M. E., Halperin R., Yee J., "Evaluation of the two-needle strategy for reducing reactions to DPT vaccination". *Am. J. Dis. Child.* 141, 796-798 (1987).  
2. Lanza G. A., Barone L., Scalone G. *et al.* "Inflammation-related effects of adjuvant influenza A vaccination on platelet activation and cardiac autonomic function". *J. Intern. Med.* 269, 118-125 (2011).  
20 3. Jae S. Y., Heffernan K. S., Park S. H. *et al.* "Does an acute inflammatory response temporarily attenuate parasympathetic reactivation?" *Clin. Auton. Res.* 20, 229-233 (2010).  
4. Sever J. L., Brenner A. I., Gale A. D. *et al.* "Safety of anthrax vaccine: an expanded review and evaluation of adverse events reported to the Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS)". *Pharmacoepidemiol. Drug Saf.* 13, 825-840 (2004).  
25 5. Minor P. "Vaccine-derived poliovirus (VDPV): impact on poliomyelitis eradication". *Vaccine* 27, 2649-2652 (2009).  
6. Poland G. A., Grabenstein J. D., Neff J. M. "The US smallpox vaccination program: a review of a large modern era smallpox vaccination implementation program". *Vaccine* 23, 2078-2081 (2005).  
7. Lewis D. J., Huo Z., Barnett S. *et al.* "Transient facial nerve paralysis (Bell's palsy) following intranasal delivery of a genetically detoxified mutant of Escherichia coli heat labile toxin". *PLoS ONE* 4, e6999 (2009).  
30 8. Couch R. B. "Nasal vaccination, Escherichia coli enterotoxin, and Bell's palsy". *N. Engl. J. Med.* 350, 860-861 (2004).  
9. Carlson B. C., Jansson A M, Larsson A, Bucht A, Lorentzen J C. "The endogenous adjuvant squalene can induce a chronic T-cell-mediated arthritis in rats". *Am. J. Pathol.* 156, 2057-2065 (2000).  
35 10. Finch C. E., Crimmins E M. "Inflammatory exposure and historical changes in human life-spans". *Science* 305, 1736-1739 (2004).  
11. Gregor M. F., Hotamisligil G S. "Inflammatory mechanisms in obesity". *Annu. Rev. Immunol.* 29, 415-445 (2011).  
12. O'Callaghan D. S., O'Donnell D., O'Connell F., O'Byrne K. J. "The role of inflammation in the pathogenesis of nonsmall cell lung cancer". *J. Thorac. Oncol.* 5, 2024-2036 (2010).  
40 13. Witte M. E., Geurts J. J., de Vries H. E., van der Valk P., van Horsen J. "Mitochondrial dysfunction: a potential link between neuroinflammation and neurodegeneration?" *Mitochondrion* 10, 411-418 (2010).  
14. Gallichan W. S., Rosenthal K. L. "Long-lived cytotoxic T lymphocyte memory in mucosal tissues after mucosal but not systemic immunization". *J. Exp. Med.* 184, 1879-1890 (1996).  
15. Saurer L., McCullough K. C., Summerfield A. In vitro induction of mucosa-type dendritic cells by all-trans

- retinoic acid". *J. Immunol.* 179, 3504-3514 (2007).
16. Molenaar R., Greuter M., van der Marel A. P. *et al.* "Lymph node stromal cells support dendritic cell-induced gut-homing of T cells". *J. Immunol.* 183, 6395-6402 (2009).
17. Tang D. C., Van Kampen K. R. "Toward the development of vectored vaccines in compliance with evolutionary medicine". *Expert Rev. Vaccines* 7(4), 399-402 (2008).
- 5 18. Karron R. A., Talaat K., Luke C. *et al.* "Evaluation of two live attenuated cold adapted H5N1 influenza virus vaccines in healthy adults". *Vaccine* 27, 4953-4960 (2009).
19. Van Kampen K. R., Shi Z., Gao P. *et al.* "Safety and immunogenicity of adenovirus vectored nasal and epicutaneous influenza vaccines in humans". *Vaccine* 23, 1029-1036 (2005).
- 10 20. Tang D. C., Shi Z., Curiel D. T. "Vaccination onto bare skin". *Nature* 388, 729-730 (1997).
21. Zhang J., Shi Z., Kong F. K. *et al.* "Topical application of Escherichia coli-vectored vaccine as a simple method for eliciting protective immunity". *Infect. Immun.* 74, 3607-3617 (2006).
22. Glenn G. M., Taylor D. N., Li X. *et al.* "Transcutaneous immunization: a human vaccine delivery strategy using a patch". *Nat. Med.* 6, 1403-1406 (2000).
- 15 23. Sullivan S. P., Koutsonanos D. G., del Pilar Martin M. *et al.* "Dissolving polymer microneedle patches for influenza vaccination". *Nat. Med.* 16, 915-920 (2010).
24. Kaplan D. H. "In vivo function of Langerhans cells and dermal dendritic cells". *Trends Immunol.* 31, 446-451 (2010).
25. Soloff A. C., Barratt-Boyes S. M. "Enemy at the gates: dendritic cells and immunity to mucosal pathogens". *Cell Res.* 20, 872-885 (2010).
- 20 26. Brandes M., Willmann K., Moser B. "Professional antigen-presentation function by human gammadelta T cells". *Science* 309, 264-268 (2005).
27. Feng T., Cong Y., Qin H., Benveniste E. N., Elson C. O. "Generation of mucosal dendritic cells from bone marrow reveals a critical role of retinoic acid". *J. Immunol.* 185, 5915-5925 (2010).
- 25 28. Kaufman D. R., Bivas-Benita M., Simmons N. L., Miller D., Barouch D. H. "Route of adenovirus-based HIV-1 vaccine delivery impacts the phenotype and trafficking of vaccine-elicited CD8+ T lymphocytes". *J. Virol.* 84, 5986-5996 (2010)
29. San Martin C., Burnett R. M. "Structural studies on adenoviruses". *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 272, 57-94 (2003).
- 30 30. Lichtenstein D. L., Wold W. S. "Experimental infections of humans with wild-type adenoviruses and with replication competent adenovirus vectors: replication, safety, and transmission". *Cancer Gene Ther.* 11, 819-829 (2004).
31. Howell M. R., Nang R. N., Gaydos C. A., Gaydos J. C. "Prevention of adenoviral acute respiratory disease in Army recruits: cost-effectiveness of a military vaccination policy". *Am. J. Prev. Med.* 14, 168-175 (1998).
- 35 32. Haj-Ahmad Y., Graham F. L. "Development of a helper-independent human adenovirus vector and its use in the transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene". *J. Virol.* 57, 267-274 (1986).
33. Zhu J., Grace M., Casale J. *et al.* "Characterization of replication-competent adenovirus isolates from large-scale production of a recombinant adenoviral vector". *Hum. Gene Ther.* 10, 113-121 (1999).
34. Fallaux F. J., Bout A., van der Velde I. *et al.* "New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses". *Hum. Gene Ther.* 9, 1909-1917 (1998).
- 40 35. Tang D. C., Zhang J., Toro H., Shi Z., Van Kampen K. R. "Adenovirus as a carrier for the development of influenza virus-free avian influenza vaccines". *Expert Rev. Vaccines* 8, 469-481 (2009).
36. Wang L., Cheng C., Ko S. Y. *et al.* "Delivery of human immunodeficiency virus vaccine vectors to the intestine induces enhanced mucosal cellular immunity". *J. Virol.* 83, 7166-7175 (2009).
- 45 37. Tang J., Olive M., Champagne K. *et al.* "Adenovirus hexon T-cell epitope is recognized by most adults and is restricted by HLA DP4, the most common class II allele". *Gene Ther.* 11, 1408-1415 (2004).
38. Nwanegbo E., Vardas E., Gao W. *et al.* "Prevalence of neutralizing antibodies to adenoviral serotypes 5 and 35 in the adult populations of The Gambia, South Africa, and the United States". *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 11, 351-357 (2004).
- 50 39. Barouch D. H., Kik S. V., Weverling G. J. *et al.* "International seroepidemiology of adenovirus serotypes 5, 26, 35, and 48 in pediatric and adult populations". *Vaccine* 29, 5203-5209 (2011).
40. Yang Y., Nunes F. A., Berencsi K. *et al.* "Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy". *Proc. Natl Acad. Sci.*, EE.UU. 91, 4407-4411 (1994).
41. Croyle M. A., Patel A., Tran K. N. *et al.* "Nasal delivery of an adenovirus-based vaccine bypasses pre-existing immunity to the vaccine carrier and improves the immune response in mice". *PLoS ONE* 3, e3548 (2008).
- 55 42. Stone D., Liu Y., Li Z. Y. *et al.* "Comparison of adenoviruses from species B, C, E, and F after intravenous delivery". *Mol. Ther.* 15, 2146-2153 (2007).
43. Sharma A., Bangari D. S., Tandon M. *et al.* "Comparative analysis of vector biodistribution, persistence and gene expression following intravenous delivery of bovine, porcine and human adenoviral vectors in a mouse model". *Virology* 386, 44-54 (2009).
- 60 44. Roy S., Medina-Jaszek A., Wilson M. J. *et al.* "Creation of a panel of vectors based on ape adenovirus isolates". *J. Gene Med.* 13, 17-25 (2011).
45. Patel A., Tikoo S., Kobinger G. A. "porcine adenovirus with low human seroprevalence is a promising alternative vaccine vector to human adenovirus 5 in an H5N1 virus disease model". *PLoS ONE* 5, e15301 (2010).
- 65 46. Chen E. C., Yaqi S., Kelly K. R. *et al.* "Crossspecies transmission of a novel adenovirus associated with a fulminant pneumonia outbreak in a new world monkey colony". *PLoS Pathog.* 7, e1002155 (2011).

47. Seto J., Walsh M. P., Metzgar D., Seto D., "Computational analysis of adenovirus serotype 5 (HAdV-C5) from an HAdV coinfection shows genome stability after 45 years of circulation". *Virology* 404, 180-186 (2010).
48. Boyer J. L., Sofer-Podesta C., Ang J. *et al.* "Protective immunity against a lethal respiratory *Yersinia pestis* challenge induced by V antigen or the F1 capsular antigen incorporated into adenovirus capsid". *Hum. Gene Ther.* 21, 891-901 (2010).
- 5 49. Worgall S., Krause A., Qiu J. *et al.* "Protective immunity to *Pseudomonas aeruginosa* induced with a capsid-modified adenovirus expressing P. *aeruginosa* OprF". *J. Virol.* 81, 13801-13808 (2007).
50. Osada T., Yang X. Y., Hartman Z. C. *et al.* "Optimization of vaccine responses with an E1, E2b and E3-deleted Ad5 vector circumvents pre-existing anti-vector immunity". *Cancer Gene Ther.* 16, 673-682 (2009).
- 10 51. Gabitzsch E. S., Xu Y., Yoshida L. H. *et al.* "Novel adenovirus type 5 vaccine platform induces cellular immunity against HIV-1 Gag, Pol, Nef despite the presence of Ad5 immunity". *Vaccine* 27, 6394-6398 (2009).
52. Parks R. J., Chen L., Anton M. *et al.* "A helper-dependent adenovirus vector system: removal of helper virus by Cre-mediated excision of the viral packaging signal". *Proc. Natl Acad. Sci., EE.UU.* 93, 13565-13570 (1996).
53. Shi Z., Zeng M., Yang G. *et al.* "Protection against tetanus by needle-free inoculation of adenovirus-vectored nasal and epicutaneous vaccines". *J. Virol.* 75, 11474-11482 (2001).
- 15 54. Song K., Bolton D. L., Wilson R. L. *et al.* Genetic immunization in the lung induces potent local and systemic immune responses". *Proc. Natl Acad. Sci., EE.UU.* 107, 22213-22218 (2010).
55. Raper S. E., Chirmule N., Lee F. S. *et al.* "Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer". *Mol. Genet. Metab.* 80, 148-158 (2003).
- 20 56. Hartman Z. C., Appledorn D. M., Amalfitano A. "Adenovirus vector induced innate immune responses: impact upon efficacy and toxicity in gene therapy and vaccine applications". *Virus Res.* 132, 1-14 (2008).
57. Higashimoto Y., Yamagata Y., Itoh H. "Complex effect of adenovirus early region proteins on innate immune system". *In flamm. Allergy Drug Targets* 5, 229-237 (2006).
58. Buchbinder S. P., Mehrotra D. V., Duerr A. *et al.* "Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step study): a double-blind, randomised, placebo controlled, test-of-concept trial". *Lancet* 372, 1881-1893 (2008).
- 25 59. McElrath M. J., De Rosa S. C., Moodie Z. *et al.* "HIV-1 vaccine-induced immunity in the test-of-concept Step Study: a case-cohort analysis". *Lancet* 372, 1894-1905 (2008).
60. Appledorn D. M., Aldhamen Y. A., Godbehere S., Seregin S. S., Amalfitano A. "Sublingual administration of an adenovirus serotype 5 (Ad5)-based vaccine confirms Toll-like receptor agonist activity in the oral cavity and elicits improved mucosal and systemic cell-mediated responses against HIV antigens despite preexisting Ad5 immunity". *Clin. Vaccine Immunol.* 18, 150-160 (2011).
61. Benlahrech A., Harris J., Meiser A. *et al.* "Adenovirus vector vaccination induces expansion of memory CD4 T cells with a mucosal homing phenotype that are readily susceptible to HIV-1". *Proc. Natl Acad. Sci., EE.UU.* 106, 19940-19945 (2009).
- 35 62. Joseph A., Itskovitz-Cooper N., Samira S. *et al.* "A new intranasal influenza vaccine based on a novel polycationic lipid-ceramide carbamoyl-spermine (CCS) I. Immunogenicity and efficacy studies in mice". *Vaccine* 24, 3990-4006 (2006).
63. Wang J., Thorson L., Stokes R. W. *et al.* "Single mucosal, but not parenteral, immunization with recombinant adenoviral-based vaccine provides potent protection from pulmonary tuberculosis". *J. Immunol.* 173, 6357-6365 (2004).
- 40 64. Ockenhouse C., "Prime boost regimens of DNA and adenovirus-vectored malaria vaccines: lessons learned from preclinical and clinical studies". Presented en Conference of Gene Based Vaccines. Viena, Austria, 13-14 Sep. 2010.
- 45 65. McWilliam A. S., Nelson D. J., Holt P. G. The biology of airway dendritic cells. *Immunol. Cell Biol.* 73, 405-413 (1995).
66. Brandtzaeg P., "Potential of nasopharynx associated lymphoid tissue for vaccine responses in the airways". *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 183, 1595-1604 (2011).
- 50 67. Lubeck M. D., Natuk R. J., Chengalvala M. *et al.* "Immunogenicity of recombinant adenovirus-human immunodeficiency virus vaccines in chimpanzees following intranasal administration". *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 10, 1443-1449 (1994).
68. Lemiale F., Kong W. P., Akyurek L. M. *et al.* "Enhanced mucosal immunoglobulin A response of intranasal adenoviral vector human immunodeficiency virus vaccine and localization in the central nervous system". *J. Virol.* 77, 10078-10087 (2003).
- 55 69. Gallichan W. S., Rosenthal K. L. "Long-term immunity and protection against herpes simplex virus type 2 in the murine female genital tract after mucosal but not systemic immunization". *J. Infect. Dis.* 177, 1155-1161 (1998).
70. Lobanova L. M., Baig T. T., Tikoo S. K., Zakhartchouk A. N. "Mucosal adenovirus-vectored vaccine for measles". *Vaccine* 28, 7613-7619 (2010).
- 60 71. del Rio M. L., Bernhardt G., Rodriguez-Barbosa J. I., Förster R. "Development and functional specialization of CD103+ dendritic cells". *Immunol. Rev.* 234, 268-281 (2010).
72. Zhang Z., Krimmel J., Zhang Z., Hu Z., Seth P. "Systemic delivery of a novel liverdetargeted oncolytic adenovirus causes reduced liver toxicity but maintains the antitumor response in a breast cancer bone metastasis model". *Hum. Gene Ther.* (In Press) (2011).
- 65 73. Li C., Ziegler R. J., Cherry M. *et al.* "Adenovirus-transduced lung as a portal for delivering alpha-galactosidase A into systemic circulation for Fabry disease". *Mol. Ther.* 5, 745-754 (2002).

74. Toovey S. "Influenza-associated central nervous system dysfunction: a literature review". *Travel Med. Infect. Dis.* 6, 114-124 (2008).
75. Carter N. J., Curran M. P. "Live attenuated influenza vaccine (FluMist®; Fluenz™): a review of its use in the prevention of seasonal influenza in children and adults". *Drugs* 71, 1591-1622 (2011).
- 5 76. Zhang S. Y., Jouanguy E., Ugolini S. *et al.* "TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis". *Science* 317, 1522-1527 (2007).
77. Hoelscher M. A., Garg S., Bangari D. S. *et al.* "Development of adenoviral-vector-based pandemic influenza vaccine against antigenically distinct human H5N1 strains in mice". *Lancet* 367, 475-481 (2006).
- 10 78. Gao W., Soloff A. C., Lu X. *et al.* "Protection of mice and poultry from lethal H5N1 avian influenza virus through adenovirus-based immunization". *J. Virol.* 80, 1959-1964 (2006).
79. Xiang Z. Q., Yang Y., Wilson J. M., Ertl H. C. "A replication-defective human adenovirus recombinant serves as a highly efficacious vaccine carrier". *Virology* 219, 220-227 (1996).
80. Tang D. C., DeVit M., Johnston S. A. "Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response". *Nature* 356, 152-154 (1992).
- 15 81. Jones S., Evans K., McElwaine-Johnn H. *et al.* "DNA vaccination protects against an influenza challenge in a double-blind randomised placebo-controlled Phase Ib clinical trial". *Vaccine* 27, 2506-2512 (2009).
82. Ulmer J. B., Donnelly J. J., Parker S. E. *et al.* "Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein". *Science* 259, 1745-1748 (1993).
- 20 83. van Drunen Littel-van den Hurk S., Hannaman D. "Electroporation for DNA immunization: clinical application". *Expert Rev. Vaccines* 9(5), 503-517 (2010).
84. Kutzler M. A., Weiner D. B. "DNA vaccines: ready for prime time?" *Nat. Rev. Genet.* 9, 776-788 (2008).
85. Peng Z. "Current status of gendicine in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers". *Hum. Gene Ther.* 16, 1016-1027 (2005).
- 25 86. Evans R. K., Nawrocki D. K., Isopi L. A. *et al.* "Development of stable liquid formulations for adenovirus-based vaccines". *J. Pharm. Sci.* 93, 2458-2475 (2004).
87. Alcock R., Cottingham M. G., Rollier C. S. *et al.* "Long-term thermostabilization of live pox viral and adenoviral vaccine vectors at supraphysiological temperatures in carbohydrate glass". *Sci. Transl. Med.* 2, 19ra12 (2010).
88. Croyle M. A., Cheng X., Wilson J. M. "Development of formulations that enhance physical stability of viral vectors for gene therapy". *Gene Ther.* 8, 1281-1290 (2001).
- 30 89. Zhang J., Tarbet E. B., Feng T. *et al.* "Adenovirus-vectored drug-vaccine duo as a rapid-response tool for conferring seamless protection against influenza". *PLoS ONE* 6, e22605 (2011).
90. Yamaguchi T., Kawabata K., Kouyama E. *et al.* "Induction of type I interferon by adenovirus-encoded small RNAs". *Proc. Natl Acad. Sci.*, EE.UU. 107, 17286-17291 (2010).
- 35 91. Thiele A. T., Sumpter T. L., Walker J. A. *et al.* "Pulmonary immunity to viral infection: adenovirus infection of lung dendritic cells renders T cells nonresponsive to interleukin-2". *J. Virol.* 80, 1826-1836 (2006).
92. Zhu J., Huang X., Yang Y. "A critical role for type I IFN-dependent NK cell activation in innate immune elimination of adenoviral vectors in vivo". *Mol. Ther.* 16, 1300-1307 (2008).
93. Tuvim M. J., Evans S. E., Clement C. G., Dickey B. F., Gilbert B. E. "Augmented lung inflammation protects against influenza A pneumonia". *PLoS ONE* 4, e4176 (2009).
- 40 94. Norton E. B., Clements J. D., Voss T. G., Cardenas-Freytag L. "Prophylactic administration of bacterially derived immunomodulators improves the outcome of influenza virus infection in a murine model". *J. Virol.* 84, 2983-2995 (2010).
95. Poland G. A., Jacobson R. M., Ovsyannikova I. G. "Influenza virus resistance to antiviral agents: a plea for rational use". *Clin. Infect. Dis.* 48, 1254-1256 (2009).
- 45 96. Takahashi E., Kataoka K., Fujii K. *et al.* "Attenuation of inducible respiratory immune responses by oseltamivir treatment in mice infected with influenza A virus". *Microbes Infect.* 12, 778-783 (2010).
97. Toro H., Tang D. C., Suarez D. L. *et al.* "Protective avian influenza in ovo vaccination with non-replicating human adenovirus vector". *Vaccine* 25, 2886-2891 (2007).
- 50 98. Toro H., Tang D. C., Suarez D. L., Zhang J., Shi Z. "Protection of chickens against avian influenza with non-replicating adenovirus-vectored vaccine". *Vaccine* 26, 2640-2646 (2008).
99. Toro H., Tang D. C. "Protection of chickens against avian influenza with non-replicating adenovirus-vectored vaccine". *Poult. Sci.* 88, 867-871 (2009).
100. Avakian A. P., Poston R. M., Kong F. K., Van Kampen K. R., Tang D. C. "Automated mass immunization of poultry: the prospect for nonreplicating human adenovirus-vectored in ovo vaccines". *Expert Rev. Vaccines* 6(3), 457-465 (2007).
- 55 101. Singh S., Toro H., Tang D. C. *et al.* "Non replicating adenovirus vectors expressing avian influenza virus hemagglutinin and nucleocapsid proteins induce chicken specific effector, memory and effector memory CD8+ T lymphocytes". *Virology* 405, 62-69 (2010).
102. Toro H., Suarez D. L., Tang D. C., van Ginkel F. W., Breedlove C. "Avian influenza mucosal vaccination in chickens with replication-defective recombinant adenovirus vaccine". *Avian Dis.* 55, 43-47 (2011).
- 60 103. van Ginkel F., Tang D. C., Gulley S. L., Toro H. "Induction of mucosal immunity in the avian Harderian gland with a replication deficient Ad5 vector expressing avian influenza H5 hemagglutinin". *Dev. Comp. Immunol.* 33, 28-34 (2009).
104. Wesley R. D., Tang M., Lager K. M. "Protection of weaned pigs by vaccination with human adenovirus 5 recombinant viruses expressing the hemagglutinin and the nucleoprotein of H3N2 swine influenza virus". *Vaccine* 22, 3427-3434 (2004).
- 65

105. Toro H., van Ginkel F. W., Tang D. C. *et al.* "Avian influenza vaccination in chickens and pigs with replication-competent adenovirus-free human recombinant adenovirus 5". *Avian Dis.* 54(1 Supl.), 224-231 (2010).
106. Henderson H., Jackson F., Bean K. *et al.* "Oral immunization of raccoons and skunks with a canine adenovirus recombinant rabies vaccine". *Vaccine* 27, 7194-7197 (2009).
- 5 107. Geisbert T. W., Bailey M., Hensley L. *et al.* "Recombinant adenovirus serotype 26 (Ad26) and Ad35 vaccine vectors bypass immunity to Ad5 and protect nonhuman primates against ebolavirus challenge". *J. Virol.* 85, 4222-4233 (2011).
108. Pratt W. D., Wang D., Nichols D. K. *et al.* "Protection of nonhuman primates against two species of Ebola virus infection with a single complex adenovirus vector". *Clin. Vaccine Immunol.* 17, 572-581 (2010).
- 10 109. Geisbert T. W., Bailey M., Geisbert J. B. *et al.* "Vector choice determines immunogenicity and potency of genetic vaccines against Angola Marburg virus in nonhuman primates". *J. Virol.* 84, 10386-10394 (2010).
110. Xing Z., McFarland C. T., Sallenave J. M. *et al.* "Intranasal mucosal boosting with an adenovirus-vector vaccine markedly enhances the protection of BCG-primed guinea pigs against pulmonary tuberculosis". *PLoS ONE* 4, e5856 (2009).
- 15 111. McConnell M. J., Hanna P. C., Imperiale M. J. "Adenovirus-based prime-boost immunization for rapid vaccination against anthrax". *Mol. Ther.* 15, 203-210 (2007).
112. Wei C. J., Boyington J. C., McTamney P. M. *et al.* "Induction of broadly neutralizing H1N1 influenza antibodies by vaccination". *Science* 329, 1060-1064 (2010).
113. Safronetz D., Hegde N. R., Ebihara H. *et al.* "Adenovirus vectors expressing hantavirus proteins protect hamsters against lethal challenge with andes virus". *J. Virol.* 83, 7285-7295 (2009).
- 20 114. Xu Q., Pichichero M. E., Simpson L. L. *et al.* "An adenoviral vector-based mucosal vaccine is effective in protection against botulism". *Gene Ther.* 16, 367-375 (2009).
115. Chiuchiolo M. J., Boyer J. L., Krause A. *et al.* "Protective immunity against respiratory tract challenge with *Yersinia pestis* in mice immunized with an adenovirus-based vaccine vector expressing V antigen". *J. Infect. Dis.* 194, 1249-1257 (2006).
- 25 116. Fox J. L. "FDA, producers moving toward mammalian cell-based flu vaccines". *Microbe* 1, 54-55 (2006).
117. Boyer J. L., Kobinger G, Wilson J M, Crystal R G. "Adenovirus-based genetic vaccines for biodefense". *Hum. Gene Ther.* 16, 157-168 (2005).

#### 30 *Ejemplo 4. Agentes terapéuticos e inmunológicos de acción rápida y prolongada contra la gripe vectorizados con adenovirus*

El objetivo del RAP1T contra la gripe vectorizado con Ad5 es desarrollar un agente terapéutico e inmunológico de acción rápida y prolongada contra la gripe (RAPIT) que se pueda producir en masa a bajo coste y administrarse en masa por personal no médico; con la capacidad de conferir protección rápida/sostenida contra la gripe, pero sin el potencial de inducir resistencia a los fármacos ni redistribución con un virus de la gripe de tipo silvestre. No existe la necesidad de propagar un virus de la gripe ni ninguna necesidad de la inyección con aguja por parte de personal médico autorizado.

40 Es posible generar rápidamente la vacuna contra la gripe vectorizada con Ad5 sin desarrollar el virus de la gripe. En un virus de la gripe, el crecimiento varía de una cepa a otra, algunas cepas son letales, es propenso a eventos de redistribución y mutación, y hay protección de bajo título en los huevos. En un vector de Ad que codifica la HA de la gripe, hay tasas de crecimiento más uniformes, el vector es benigno, no hay eventos de redistribución, hay producción de alto título en células PER.C6 y se puede generar un nuevo Ad libre de RCA mediante el sistema AdHigh en el plazo de un mes.

Las vacunas de la gripe vectorizadas con Ad5 en células de cultivo en suspensión pueden producirse en masa. Para una vacuna contra la gripe vectorizada con Ad, la clonación de la HA de la gripe en Ad no requiere el crecimiento del virus de la gripe, un biorreactor de onda de 500 litros puede producir  $10^{16}$  partículas de Ad en un momento a partir de células en suspensión PER.C6 en medio sin suero, las partículas de Ad pueden purificarse mediante cromatografía en columna y la producción de vacunas contra la gripe vectorizadas con Ad puede simplificarse en respuesta rápida a una escalada de la demanda (FIG. 11). Para una vacuna contra la gripe convencional, algunas cepas del virus de la gripe no crecen bien en los huevos, el rendimiento medio es aproximadamente una dosis por huevo, la contaminación es más difícil de identificar en los huevos que en los cultivos celulares, puede haber alergias asociadas al huevo y el procesamiento es incómodo.

La terapia génica mediada por Ad5 y la vacunación nasal se pueden comparar de la siguiente manera. En la terapia génica, se expresa una proteína terapéutica a partir de Ad y se induce un efecto biológico directamente mediante una dosis correcta de proteína terapéutica expresada a partir de Ad en células transducidas. En la vacunación nasal, la proteína antigénica se expresa a partir de Ad, se presenta el antígeno y se induce una respuesta inmune a través de una cascada de reacciones desencadenadas por el antígeno expresado a partir del Ad en las células transducidas. Los informes en apoyo de la hipótesis de que la inmunidad preexistente al Ad no interfiere con la potencia de las vacunas nasales vectorizadas Ad incluyen Shi Z *et al.* *J. Virol.* 75: 11474, 2001 (ratones), Hoelscher M. A. *et al. Lancet* 367: 475, 2006 (ratones), Croyle M. A. *et al. PLoS ONE* 3: e3548, 2008 (ratones), Song K. *et al. PNAS* 107: 22213, 2010 (macacos) y Van Kampen K. R. *et al. Vaccine* 23: 1029, 2005 (seres humanos).

El diseño del estudio de un ensayo clínico en fase I en seres humanos de una vacuna contra la gripe aviar nasal vectorizada con Ad5 fue el siguiente. Un vector AdhVN1203/04.H5 codificó HA1+HA2 del virus de la gripe aviar A/VN/1203/04 (H5N1). El estudio fue un estudio aleatorio, de ocultación doble, controlado con placebo y de un solo sitio. Hubo tres cohortes en el escalado de la dosis de  $10^8$ ,  $10^9$  y  $10^{10}$  pv. Las dosis se administraron por pulverización nasal y dos dosis en los días 0 y 28. Hubo un total de 48 voluntarios sanos, entre 19 y 49 años. Hubo dieciséis sujetos humanos por cohorte de dosis, incluyendo 4 controles de placebo por cohorte. El cultivo celular fue una fabricación basada en un cultivo celular libre de RCA en células en suspensión PER.C6 en medio libre de suero. Los eventos adversos en el sistema respiratorio en el 30 % o más de los sujetos incluyeron rinorrea, irritación nasal, congestión nasal, tos y/o dolor de garganta.

*Ejemplo 5: Partícula de adenovirus como un agente terapéutico e inmunológico de acción rápida y prolongada (RAPIT), de amplio espectro, contra patógenos respiratorios*

La FIG. 15 representa el tratamiento profiláctico del carbunco mediante la instilación intranasal de partículas de adenovirus poco antes de la exposición a esporas.

Métodos. Se administraron por vía intranasal (i.n.) gota a gota partículas de AdE (vector vacío de Ad5 defectuoso en E1/E3 sin transgén) y AdvAV (vector de Ad5 defectuoso en E1/E3 codificante del antígeno protector de *Bacillus anthracis*) en las fosas nasales de ratones A/J hembra jóvenes (de dos meses de vida) en un volumen de 0.05 ml en una pauta de una sola dosis poco tiempo antes de la exposición i.n. con  $1 \times 10^5$  ufc (~ 25 x DL<sub>50</sub>) de esporas de *Bacillus anthracis* Sterne. Los animales expuestos se controlaron para determinar la supervivencia a diario durante 14 días.

Resultados. Las partículas de AdvAV administradas 2 días antes de la exposición protegieron el 67 % de los ratones contra el carbunco; Las partículas de AdE administradas 2 días antes de la exposición protegieron el 30 % de los ratones contra el carbunco; Las partículas de AdE administradas 1 día antes de la exposición protegieron el 22 % de los ratones contra el carbunco; los ratones de control no tratados y los ratones que recibieron partículas de AdE diluidas, todos sucumbieron al carbunco en un plazo de 5 días. AdvAV/-2, partículas de AdvAV instiladas i.n. 2 días antes de la exposición a una dosis de  $1,3 \times 10^8$  uif; AdE/-2, partículas de AdE instiladas i.n. 2 días antes de la exposición a una dosis de  $1,3 \times 10^8$  uif; AdE\*/-2, partículas de AdE instiladas i.n. 2 días antes de la exposición a una dosis de  $1,3 \times 10^6$  uif (dilución con factor de dilución de 100 en PBS); AdE/-1, partículas de AdE instiladas i.n. 1 día antes de la exposición a una dosis de  $1,3 \times 10^8$  uif; Control, ratones de control sin tratar; los números entre paréntesis representan el número de animales de cada grupo.

Significación. Los datos sugieren que las partículas de AdE o AdvAV pueden conferir un tratamiento profiláctico del carbunco de manera similar a un fármaco, probablemente activando un grupo específico de inmunidad innata que impida el crecimiento de *Bacillus anthracis* en animales infectados. Los datos sugieren que el gen PA expresado a partir de AdvAV puede conferir sinergia con la protección mediada por AdE contra el carbunco. Es probable que la pulverización nasal de partículas de AdvAV pueda conferir una protección más rápida contra el carbunco en comparación con otras vacunas contra el carbunco durante una crisis.

La FIG. 16 representa el tratamiento del carbunco posterior a la exposición mediante la instilación i.n. de partículas de AdvAV.

Métodos. Se administraron i.n. gota a gota partículas de AdvAV en las fosas nasales de ratones A/J hembra jóvenes (de 2 meses de vida) en un volumen de 0,05 ml en una pauta de una sola dosis, bien poco tiempo antes o después de la exposición i.n. con  $4 \times 10^5$  ufc (~ 100 x DL<sub>50</sub>) de esporas de *Bacillus anthracis* Sterne. Los animales expuestos se controlaron para determinar la supervivencia a diario durante 14 días.

Resultados. Las partículas de AdvAV administradas 2 días antes de la exposición protegieron el 40 % de los ratones contra el carbunco (confirmación de los resultados de la FIG. 2 y 15); las partículas de AdvAV administradas 1 hora después de la exposición retrasaron la muerte, pero no mejoraron la tasa de supervivencia; la ciprofloxacina inyectada 1 hora después de la exposición también retrasó la muerte sin éxito en la mejora de la tasa de supervivencia; las partículas de AdvAV administradas junto con la inyección de ciprofloxacina 1 hora después de la exposición protegieron el 56 % de los ratones contra el carbunco; todos los ratones de control sin tratar murieron en 5 días. AdvAV/D-2, partículas de AdvAV instiladas i.n. 2 días antes de la exposición a una dosis de  $1,3 \times 10^8$  uif; AdvAV/D0, partículas de AdvAV instiladas i.n. 1 hora después de la exposición a una dosis de  $1,3 \times 10^8$  uif; AdvAV/Cipro/D0, partículas de AdvAV instiladas i.n. 1 hora después de la exposición a una dosis de  $1,3 \times 10^8$  uif junto con la inyección i.p. de la ciprofloxacina; Cipro/D0, inyección i.p. de ciprofloxacina; Control, ratones de control no tratados sin tratamientos antes de la exposición; los números entre paréntesis representan la cantidad de animales de cada grupo.

Significación. Los datos sugieren que las partículas de AdvAV pueden conferir terapia del carbunco después de la exposición junto con tratamientos con antibióticos. La sinergia entre AdvAV y los antibióticos se reveló en este experimento. Es posible que la pulverización nasal de partículas de AdvAV pueda reducir la necesidad de usar antibióticos en una situación posterior a la exposición.

*Ejemplo 6: Partícula de adenovirus como un agente terapéutico e inmunológico de acción rápida y prolongada (RAPIT), de amplio espectro, contra patógeno respiratorio*

Recientemente, se ha demostrado que la administración intranasal (i.n.) de partículas de adenovirus de tipo 5 (Ad5)  $\Delta E1E3$ , con o sin un antígeno patógeno codificado en el genoma de Ad5, puede conferir terapia profiláctica contra la gripe antes de generarse la inmunidad adaptativa. Un vector de Ad5 que codifica antígenos patógenos puede inducir así una protección rápida y sostenida completa contra un patógeno como un dúo de fármaco-vacuna (DVD). Se ha documentado que la administración de partículas de Ad5  $\Delta E1E3$  en ratones induce rápidamente la producción de una amplia selección de citocinas inflamatorias y quimiocinas, que incluyen el interferón de tipo I (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ), deteriora las células dendríticas pulmonares; activa los linfocitos citolíticos naturales; induce la producción de óxido nítrico antivírico; desencadena interacciones multifacéticas entre Ad5 y las proteínas sanguíneas, las plaquetas, los macrófagos, las células endoteliales y las respectivas células parenquimatosas. Es posible que múltiples reacciones inducidas por las partículas de Ad5  $\Delta E1E3$  puedan combinarse para establecer un estado antigripal en las vías respiratorias, creando así una barrera de defensa multidimensional que no puede ser fácilmente superada por un virus de la gripe. Es poco probable que la gripe sea la única enfermedad que pueda ser detenida por las partículas de Ad5; también es poco probable que las partículas de Ad5 puedan contrarrestar todas las enfermedades como una panacea. Los hallazgos simplemente demuestran que una sola administración i.n. de partículas de AdE puede conferir terapia profiláctica contra al menos un subconjunto de patógenos respiratorios de la mucosa durante muchas semanas en ratones, y el uso del DVD no debería ser capaz de inducir resistencia a los fármacos, porque las partículas de AdE cambian el hábitat en las vías respiratorias sin conferir directamente presión mutacional en otros virus. La subsiguiente generación de la inmunidad protectora sostenida por el componente vacunal del DVD fortalece la eficacia. El desarrollo de una plataforma de DVD posiblemente fomentará el desarrollo de nuevas estrategias clínicas en una amplia variedad de entornos patológicos.

El objetivo de este ejemplo es evaluar el tratamiento intranasal profiláctico con AdE de Vaxin (vector vacío de Ad5 sin un transgén de RSV) en ratas algodoneras (CR) infectadas con virus respiratorio sincitial (RSV). Los puntos finales de este estudio son la demostración de títulos de virus reducidos en lavado de pulmón (3 ml) y lavado nasal (2 ml) de las ratas algodoneras infectadas (de aprox. 60-125 g de peso) en comparación con ratas algodoneras sin tratar. La cuantificación del virus se realizará mediante el ensayo de reducción de placa.

Eficacia profiláctica en el modelo de rata algodонера con RSV: ratas algodoneras (60-125 g de peso corporal):

Grupo 1: 6 CR tratadas profilácticamente (día -2) por vía intranasal con vehículo (tampón A195).  
 Grupo 2: 6 CR tratadas profilácticamente (día -30) por vía intranasal con  $2,4 \times 10^8$  uif de AdE.  
 Grupo 3: 6 CR tratadas profilácticamente (día -2) por vía intranasal con  $2,4 \times 10^8$  uif de AdE.  
 Grupo 4: 6 CR tratadas profilácticamente (día -30 y -2) por vía intranasal con  $2,4 \times 10^8$  uif de AdE durante cada ciclo de tratamiento (sensibilización/refuerzo).  
 Grupo 5: 6 CR tratadas profilácticamente (-5 h) por vía intranasal con  $2,4 \times 10^8$  uif de AdE. Virus de la exposición: RSV-Tracy (P3 w.p. 1/20/12 desarrollado en células HEp-2),  $2,25 \times 10^5$  ufp por vía intranasal (100  $\mu$ l) a ratas algodoneras (60-125 g) anestesiadas ligeramente con isoflurano. Reserva:  $2,25 \times 10^6$  ufp/ml. Vector de AdE: se almacenan vehículo (tampón A195) y AdE a concentraciones de  $2,4 \times 10^9$  a  $-80$  °C. Justo antes del uso, los materiales se calientan a temperatura ambiente. Se necesitan al menos 0,8 ml de cada tratamiento para cada grupo (6 CR/grupo x 0,1 ml de inóculo). El material no usado se mantiene a  $-80$  °C.

Colección de órganos y muestras. Después de la eutanasia con CO<sub>2</sub>, se pesa cada rata algodонера, y se registra el sexo y la edad. Se extirpará el lóbulo izquierdo y uno de los grandes lóbulos derechos de los pulmones, se enjuagarán con agua estéril para eliminar la contaminación externa de la sangre y se pesarán. El lóbulo izquierdo se lava de manera transpleural usando 3 ml de medio de Iscove con glicerina al 15 % mezclada con FBS-MEM al 2 % (1:1, v:v) en una jeringa de 3 ml con una aguja de 26 g <sup>3/8</sup> e inyectando en múltiples sitios para inflar totalmente el lóbulo. Se extrae el líquido de lavado presionando suavemente el lóbulo inflado y se usa para lavar por vía transpleural el lóbulo derecho siguiendo la misma técnica. El líquido de lavado se recoge y se almacena en hielo hasta que se titula. Para los lavados nasales del tracto respiratorio superior, se desarticulan las mandíbulas. Luego se retira la cabeza y se introduce 1 ml de medios de Iscove con glicerina al 15 % mezclada con FBS-MEM al 2 % (1:1, v:v) a través de cada narina (total de 2 ml). Se recoge el efluente de la apertura posterior de la plataforma y se almacena en hielo hasta su titulación. Las muestras no se congelan antes de la titulación, que tiene lugar al final de la recogida de las muestras.

Títulos del lavado pulmonar (ufp/g de pulmón) y títulos del lavado nasal (ufp totales) de RSV-Tracy. Los ensayos de placas se realizan usando placas de cultivo tisular de 24 pocillos que contenían monocapas casi confluentes (de 20 a 40 x 10<sup>4</sup> células/pocillo) de células HEp-2 preparadas en FCS al 10 % 24 horas antes del comienzo del ensayo. Al comienzo de cada ensayo, se realizan diluciones (en general, log<sub>10</sub> en serie) de las muestras de ensayo. A continuación, se añade una muestra de 0,2 ml de cada a los pocillos por duplicado y se deja adsorber durante 90 min con agitación suave ocasional. Tras la eliminación del inóculo, las monocapas se recubren luego con metilcelulosa al 0,75 % en FBS-MEM al 2 % que contiene antibióticos, vitaminas y otros nutrientes. Se incluyen controles de cultivo tisular y positivos en virus en cada ensayo. Las placas se colocan en una incubadora a 36 °C, y CO<sub>2</sub> al 5 %. Día 6  $\pm$  1 día después, se tiñen las placas con cristal violeta al 0,1 %/solución de formalina al 10 % (1,5

ml/pocillo) y se dejan reposar durante 24-48 horas a temperatura ambiente. Se enjuagan los pocillos con agua. Las placas, cuando están presentes, se ven fácilmente (círculos transparentes sobre un fondo azul muy oscuro). Se enumerarán todas las placas de los pocillos que contenían entre 20 y 80 placas, se promediarán y se calcularán los títulos víricos como el  $\log_{10}$  de las ufp totales para el líquido de lavado nasal o el  $\log_{10}$  de las ufp/g de tejido para los pulmones u otros órganos. El límite inferior de detección mediante este método es de aproximadamente  $1,5 \log_{10}$  de las ufp/g de tejido.

Respuesta de los anticuerpos a AdE: se extrae sangre del plexo orbitario de los Grupos 2 y 4 (3 CR/grupo) el día -30 y los Grupos 2 y 4 (6 CR/grupo) el día -2. Se recogerá sangre de los Grupos 1-5 el Día +4. Los sueros se almacenan a -20 °C.

Muestras de reserva: se reservan alícuotas de líquidos de lavado nasal y de lavado pulmonar (Grupos 1-5) y se almacenan a -80 °C. Se reservan muestras de suero del día +4 y se almacenan a -80 °C,

Tabla 6: Plan de estudio propuesto

Grupo <sup>1</sup>	Tratamiento <sup>2</sup>	Vía	Volumen (ml)	Partículas de AdE (uif/CR)	Plan de tratamiento	Cosecha	Criterio de valoración
1	Tampón, Día -2	---	0	0	Día -2	Día +4	Título vírico en el lavado pulmonar y lavado nasal por ufp
2	AdE, Día -30	i.n.	0,100	$2,4 \times 10^8$	Día -2		
3	AdE, Día -2	i.n.	0,100	$2,4 \times 10^8$	Día -30		
4	AdE, Días -30,-2	i.n.	0,100	$2,4 \times 10^8$	Días -30 y -2		
5	AdE, -5 horas	i.n.	0,100	$2,4 \times 10^8$	<b>Hora -5</b>		

Abreviaturas: i.n., intranasal; ufp, unidades formadoras de placa, <sup>1</sup>N = 6 animales/grupo; 30 animales en total. <sup>2</sup>Todos los animales se expondrán i.n. (100 µl) con RSV-Tracey (aprox.  $2,25 \times 10^5$  ufp) el día 0.

Tabla 7: Programación diaria

Miércoles Día -30 18/1/2012	Miércoles Día -2 2/15	Viernes Día 0 2/17	Sábado- Lunes Día +1 a +3	Martes Día +4 2/21	Días +5 a +16
Se tratan los Grupos 2 y 4 con AdE i.n.;  Se sangran los Grupos 2 y 4 (3 CR/gp)	Se trata el Grupo de 1 con vehículo i.n.; y los Grupos 3 y 4 con AdE i.n.;  Se sangran los Grupos 2 y 4 (6 CR/gp)	en -5 h, se trata el Grupo 5 con AdE i.n.  En 0 h, se infectan los Grupos 1-5 i.n. con RSV-Tracey	Se controlan los animales	Se recoge el lavado nasal y el lavado de los 2 lóbulos pulmonares para los títulos víricos;  Se recoge sangre de los grupos 1-5	Se controlan las titulaciones para las ufp

Abreviaturas: i.n., intranasal; ufp, unidades formadoras de placa; gp, grupo.  
Línea temporal del Día 0:  
9 a.m. → se trata el Grupo 5 con AdE i.n.  
2 p.m. → se infectan todos los grupos  
Dosis y pesos de los pulmones y del cuerpo el Día +4.

Tabla 8: Pesos pulmonares y corporales el Día +4

Grupo	Tratamiento	Dosis de AdE (uif/CR)	Peso del lóbulo pulmonar (g) <sup>1</sup>		Peso corporal (g) <sup>2</sup>	
			Media	DT	Media	DT
1	Tampón, Día -2	0	0,31	0,02	163,0	16,1
2	AdE, Día -30	2,4 x 10 <sup>8</sup>	0,35	0,05	155,9	12,1
3	AdE, Día -2	2,4 x 10 <sup>8</sup>	0,36	0,05	139,8	19,9
4	AdE, Días -30,-2	2,4 x 10 <sup>8</sup>	0,37	0,03	141,7	19,1
5	AdE, -5 Horas	2,4 x 10 <sup>8</sup>	0,38	0,04	146,1	8,7

<sup>1</sup>Hay una diferencia estadísticamente significativa entre los Grupos 1 frente a 3, 4, 5;  $p = 0,41$ ; 0,011 y 0,004, respectivamente.

<sup>2</sup>Hubo una diferencia estadísticamente significativa entre los Grupos frente a 5;  $p = 0,047$ .

Títulos de reducción de placas de lavado nasal y lavado pulmonar de RSV-Tracy:

Tabla 9: Títulos de RSV-Tracy en líquidos de lavado nasal del Día +4

Grupo	Tratamiento	Título de RSV (log <sub>10</sub> de ufp totales) en rata algodонера								Cambio (log <sub>10</sub> )	Prueba t/2 v. Gp1*
		A	B	C	D	E	F	Media	DT		
1	Tampón, Día -2	4,99	5,40	4,98	4,98	5,09	5,02	5,08	0,16	---	---
2	AdE, Día -30	5,04	5,09	4,86	5,07	5,00	4,69	4,96	0,16	-0,12	0,230
3	AdE, Día -2	4,86	5,51	5,39	Muerta	4,94	5,55	5,25	0,32	0,17	0,280
4	AdE, Días -30,-2	5,45	5,23	4,99	5,13	5,10	5,03	5,15	0,17	0,08	0,425
5	AdE, -5 Horas	5,56	5,35	5,51	5,45	5,51	5,13	5,42	0,16	0,34	0,0042

\*Detección mínima = log<sub>10</sub> de 0,7 ufp totales. Para el análisis estadístico (prueba t de Student, bilateral), la detección mínima (0 placas) se contabilizó como 0,35 de log<sub>10</sub> de ufp totales. Valores  $p$  significantes adicionales: Grupo 5 frente a 2, 4,  $p < 0,02$ .

5

Tabla 10: Títulos de RSV-Tracy en líquidos de lavado pulmonar del Día +4

Grupo	Tratamiento	Título de RSV (log <sub>10</sub> de ufp/g de pulmón) en rata algodонера								Cambio (log <sub>10</sub> )	Prueba t/2 v. Gp1*
		A	B	C	D	E	F	Media	DT		
1	Tampón, Día -2	5,06	5,18	**	5,06	5,01	5,03	5,07	0,07	-	-
2	AdE, Día -30	4,74	4,59	4,44	4,52	4,65	4,52	4,58	0,11	-0,49	0,00001 0
3	AdE, Día -2	5,03	4,26	4,60	Muerta	4,60	4,49	4,60	0,28	-0,47	0,0063
4	AdE, Días -30,-2	3,95	5,01	4,14	4,54	4,65	4,68	4,49	0,39	-0,57	0,0098
5	AdE, -5 Horas	5,02	5,34	4,53	3,88	5,45	4,65	4,81	0,59	-0,26	0,357

\*Detección mínima = log<sub>10</sub> de 1,3/g de pulmón. \*\*No había placas, aunque había virus en el líquido nasal. Por lo tanto, se supuso que los pulmones no se infectaron o error técnico. No se incluyeron los datos para el análisis. Para el análisis estadístico (prueba t de Student, bilateral), la detección mínima (0 placas) se contabilizó como 1,1 de log<sub>10</sub>/g de pulmón. No hubo valores  $p$  significantes adicionales.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un adenovirus con E1 y E3 eliminados para su uso en un método de inducción de una respuesta protectora contra patógenos respiratorios en un sujeto mamífero que lo necesita, que comprende administrar por vía intranasal, 1 o 2 días antes de la exposición al patógeno respiratorio, una cantidad eficaz del adenovirus con E1 y E3 eliminados, con o sin la codificación de un antígeno derivado del patógeno.
- 10 2. El adenovirus con E1 y E3 eliminados para el uso de la reivindicación 1, en el que dicho adenovirus con E1 y E3 eliminados es un adenovirus vacío que no codifica un antígeno derivado del patógeno.
- 15 3. El adenovirus con E1 y E3 eliminados para el uso de la reivindicación 1 o 2, en el que el patógeno respiratorio es un virus o una bacteria.
- 20 4. El adenovirus con E1 y E3 eliminados para el uso de la reivindicación 3, en el que el virus es un virus de la gripe, un virus sincitial respiratorio (RSV), un virus del catarro común o un virus del sarampión.
- 25 5. El adenovirus con E1 y E3 eliminados para el uso de la reivindicación 4, en el que el virus del catarro común es un rinovirus o un coronavirus.
- 30 6. El adenovirus con E1 y E3 eliminados para el uso de la reivindicación 3, en el que la bacteria se selecciona del grupo que consiste en *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Haemophilus* y *Mycoplasma*.
- 35 7. El adenovirus con E1 y E3 eliminados para el uso de la reivindicación 6, en el que la bacteria es *Bacillus anthracis*.
- 40 8. El adenovirus con E1 y E3 eliminados para el uso de la reivindicación 1, en el que el patógeno respiratorio es un hongo.
- 45 9. El adenovirus con E1 y E3 eliminados para el uso de la reivindicación 8, en el que el hongo es *Aspergillus*.
- 50 10. El adenovirus con E1 y E3 eliminados para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la cantidad eficaz es al menos  $10^7$  unidades infecciosas (uif) del adenovirus con E1 y E3 eliminados con o sin la codificación de un antígeno derivado del patógeno, preferentemente al menos  $10^8$  unidades infecciosas (uif) del adenovirus vacío defectuoso o con E1 y E3 eliminados, incluso más preferentemente, al menos  $10^9$  unidades infecciosas (uif) del adenovirus vacío defectuoso o con E1 y E3 eliminados.
- 55 11. El adenovirus con E1 y E3 eliminados para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que el sujeto que lo necesita es un adulto.
- 60 12. El adenovirus con E1 y E3 eliminados para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que el sujeto que lo necesita es un niño.
13. El adenovirus con E1 y E3 eliminados para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que el sujeto que lo necesita es un paciente con el sistema inmune deteriorado.
14. El adenovirus con E1 y E3 eliminados para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, que comprende al menos dos etapas de administración, en las que la administración se realiza con aproximadamente 40 días de diferencia, aproximadamente 41 días de diferencia, aproximadamente 42 días de diferencia, aproximadamente 43 días de diferencia, aproximadamente 44 días de diferencia, aproximadamente 45 días de diferencia, aproximadamente 46 días de diferencia, aproximadamente 47 días de diferencia, aproximadamente 48 días de diferencia, aproximadamente 49 días de diferencia o aproximadamente 50 días de diferencia.
15. El adenovirus con E1 y E3 eliminados para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en el que el adenovirus es un adenovirus humano, un adenovirus bovino, un adenovirus canino, un adenovirus de primate no humano, un adenovirus de pollo o un adenovirus porcino.
16. El adenovirus con E1 y E3 eliminados para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en el que la respuesta protectora se genera en un plazo de 24 horas.
17. El adenovirus con E1 y E3 eliminados para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en el que la respuesta protectora dura de aproximadamente 1 día a aproximadamente 47 días.

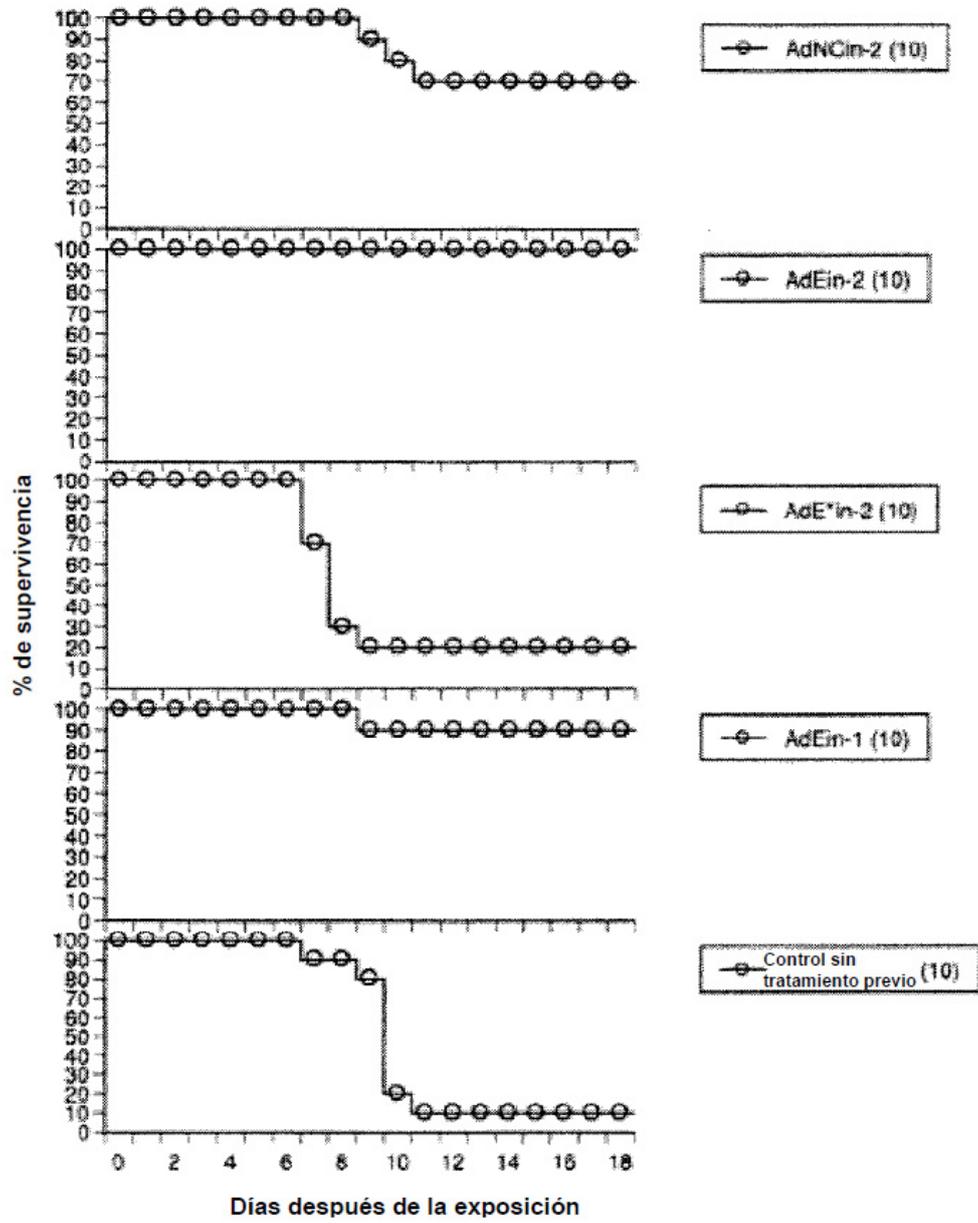
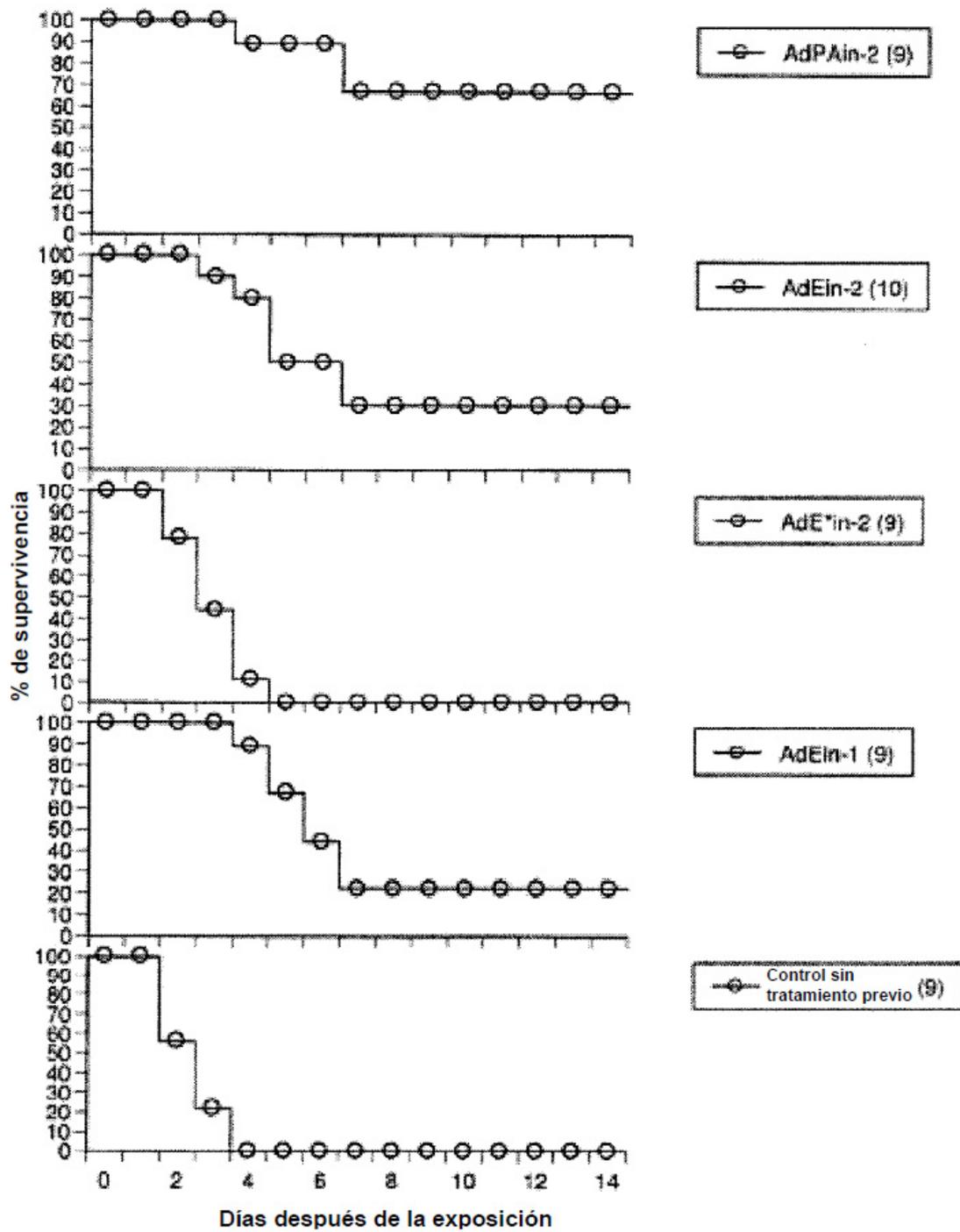
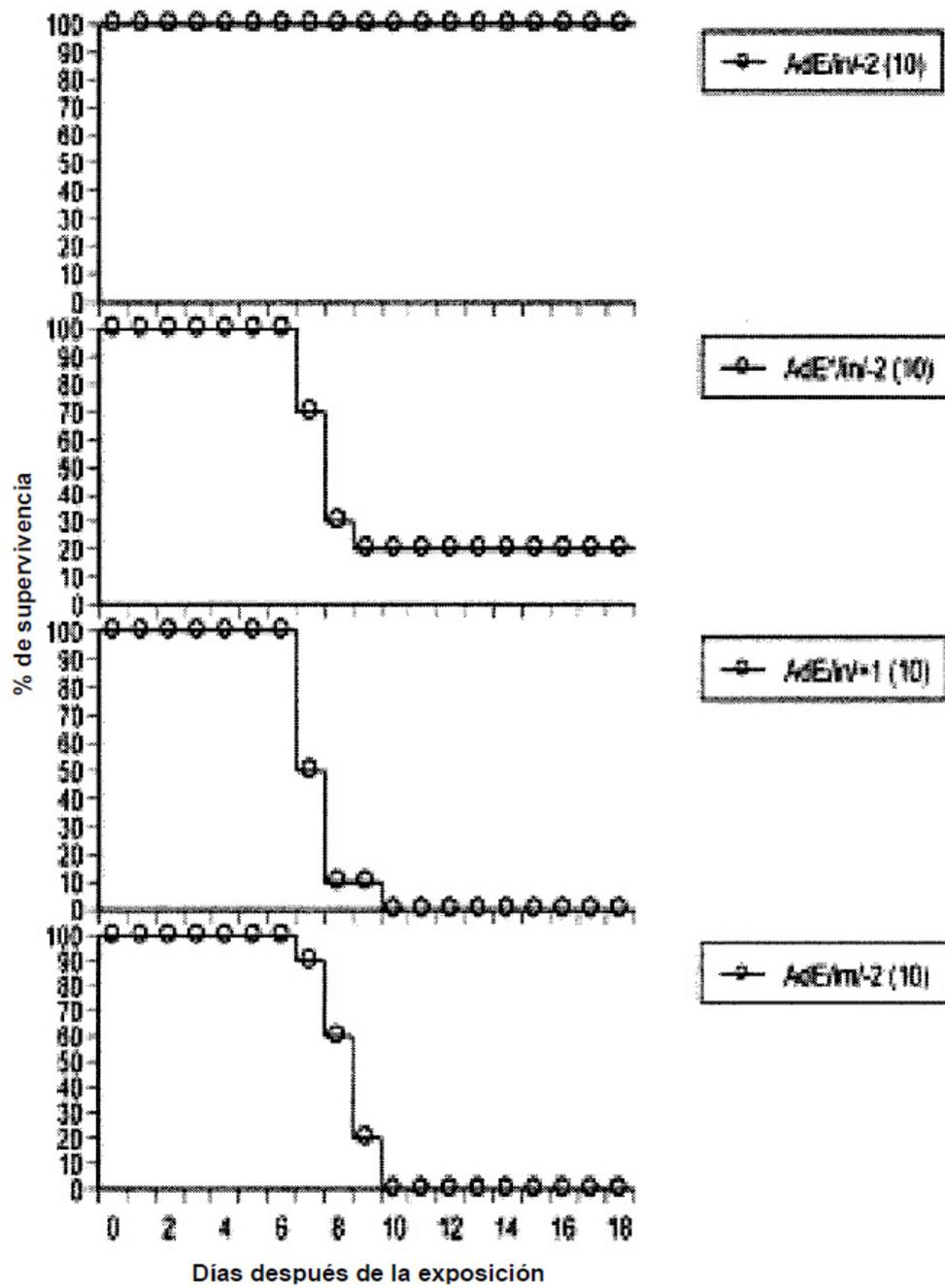


FIG. 1



**FIG. 2**



**FIG. 3A**

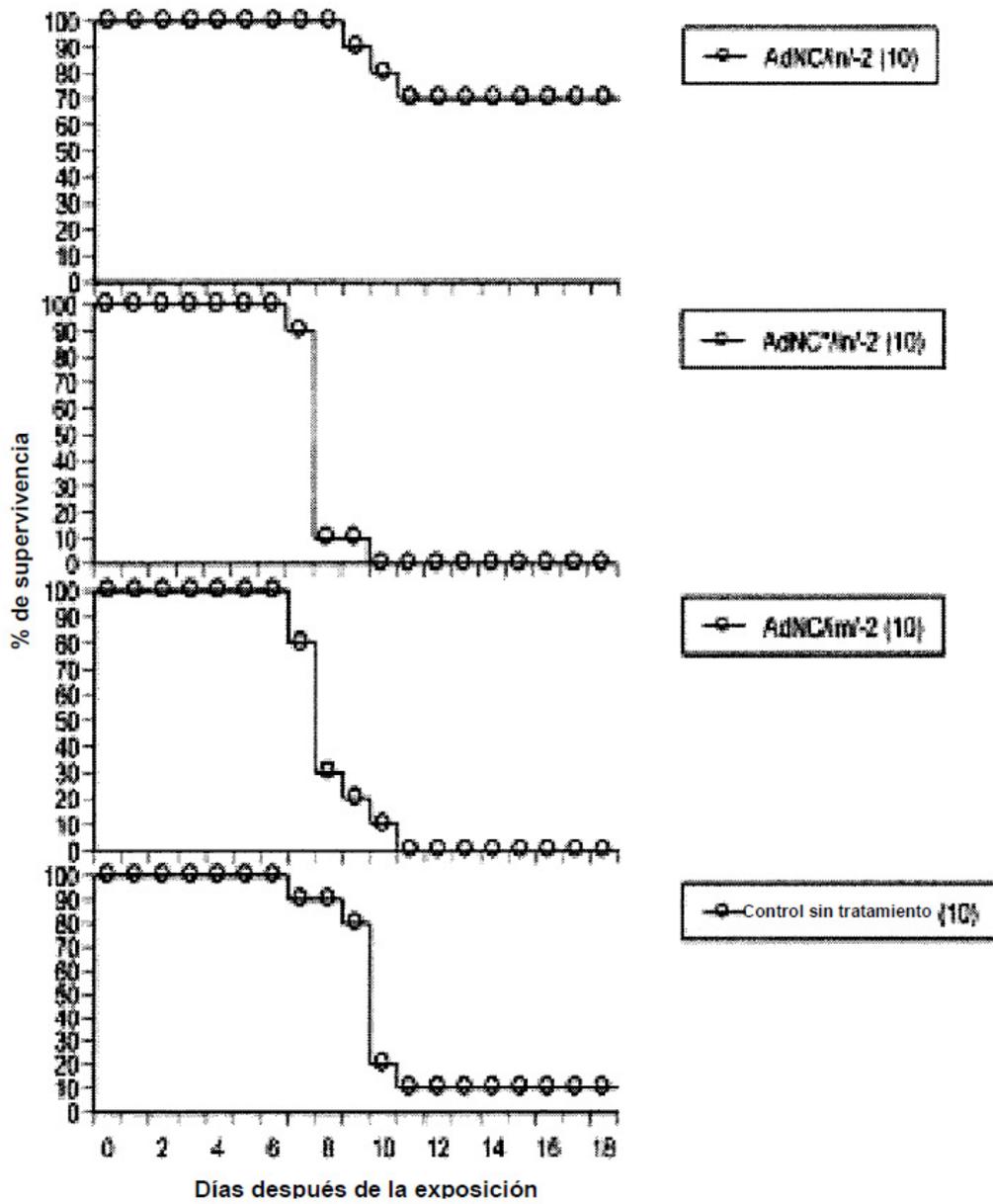
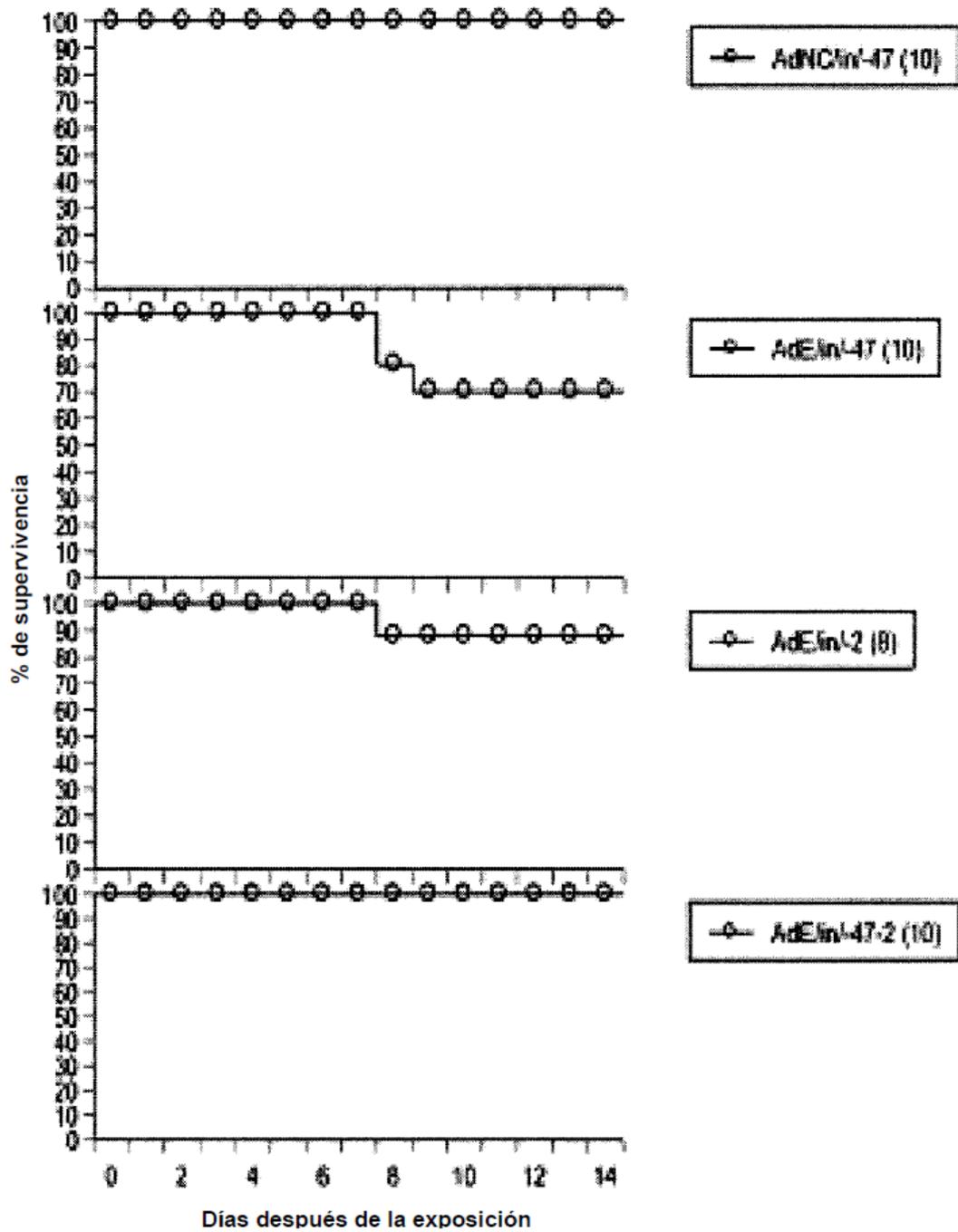
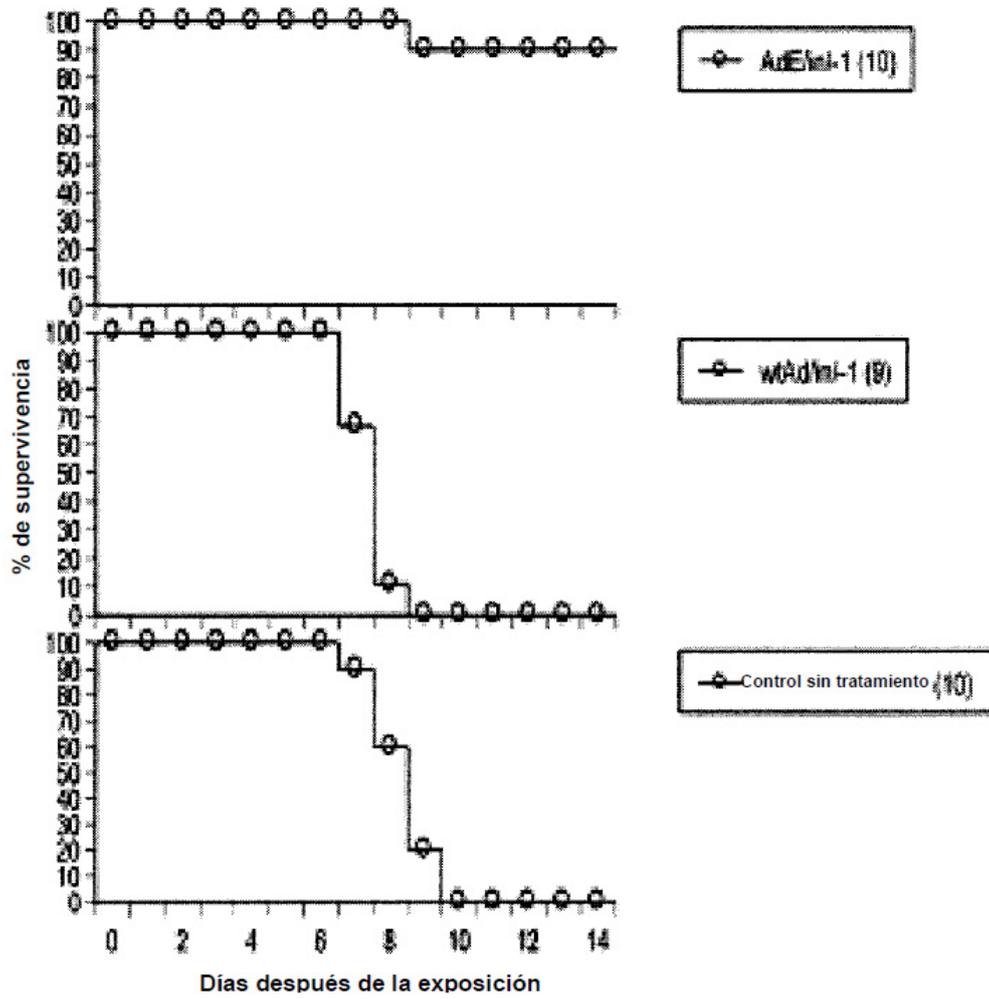


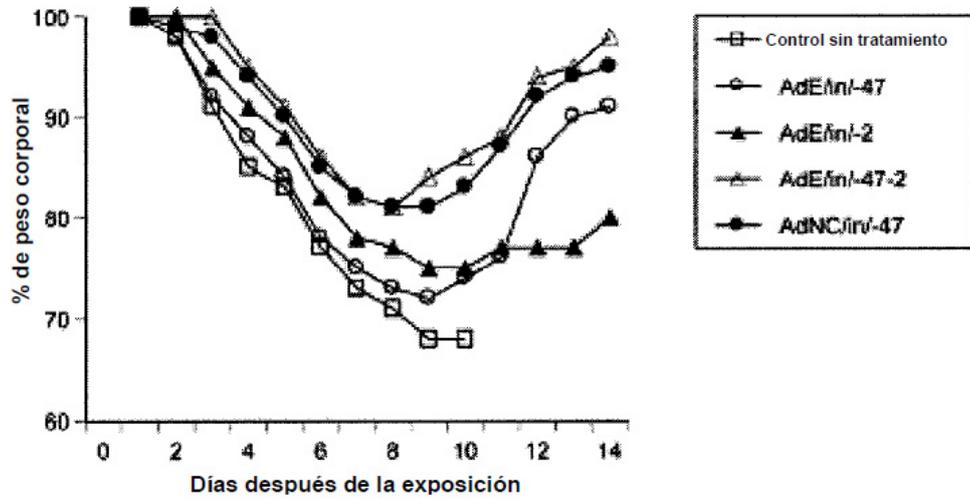
FIG. 3B



**FIG. 4A**



**FIG. 4B**



**FIG. 5**

Fig. 6A



Fig. 6B



Fig. 6C



Fig. 6D



Fig. 6E



Fig. 6F



Fig. 6G



Fig. 6H



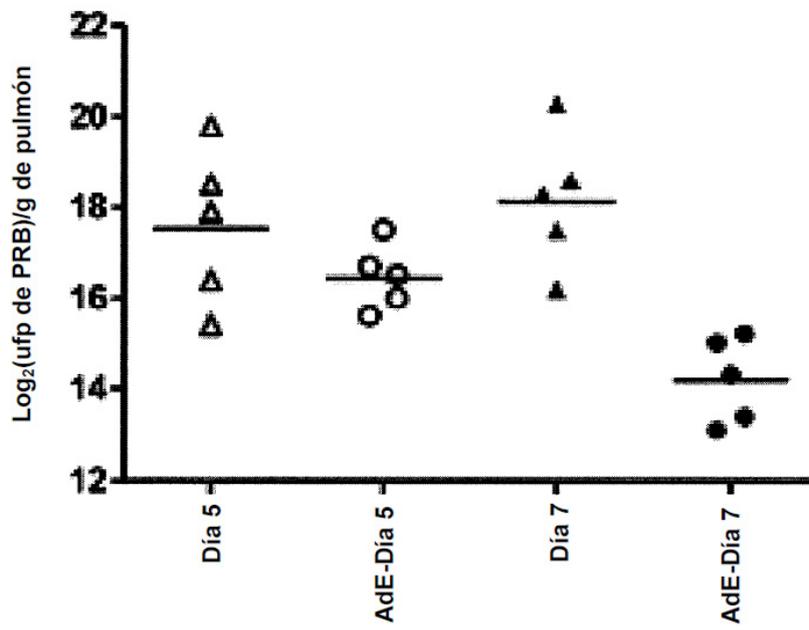


FIG. 7

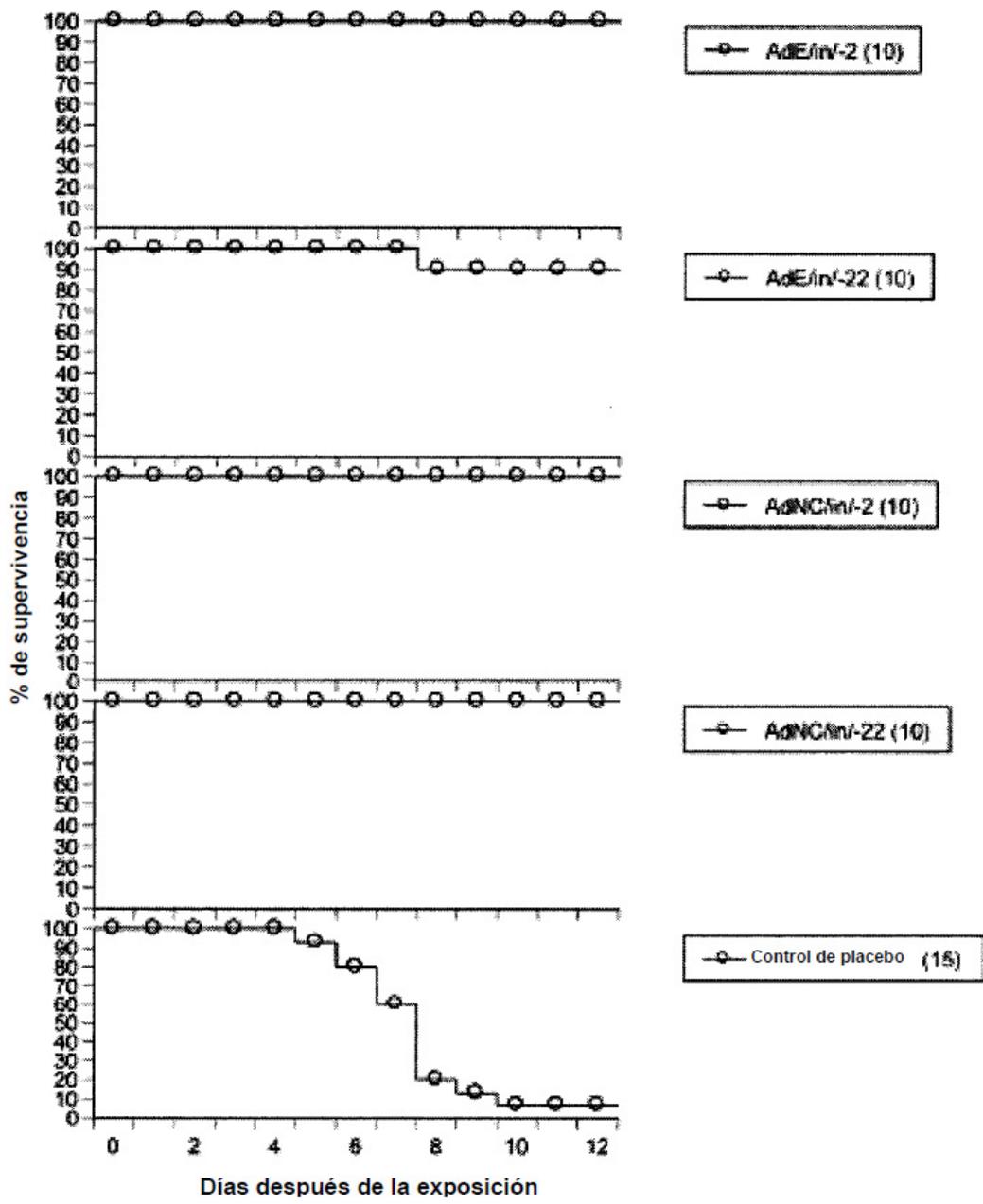


FIG. 8

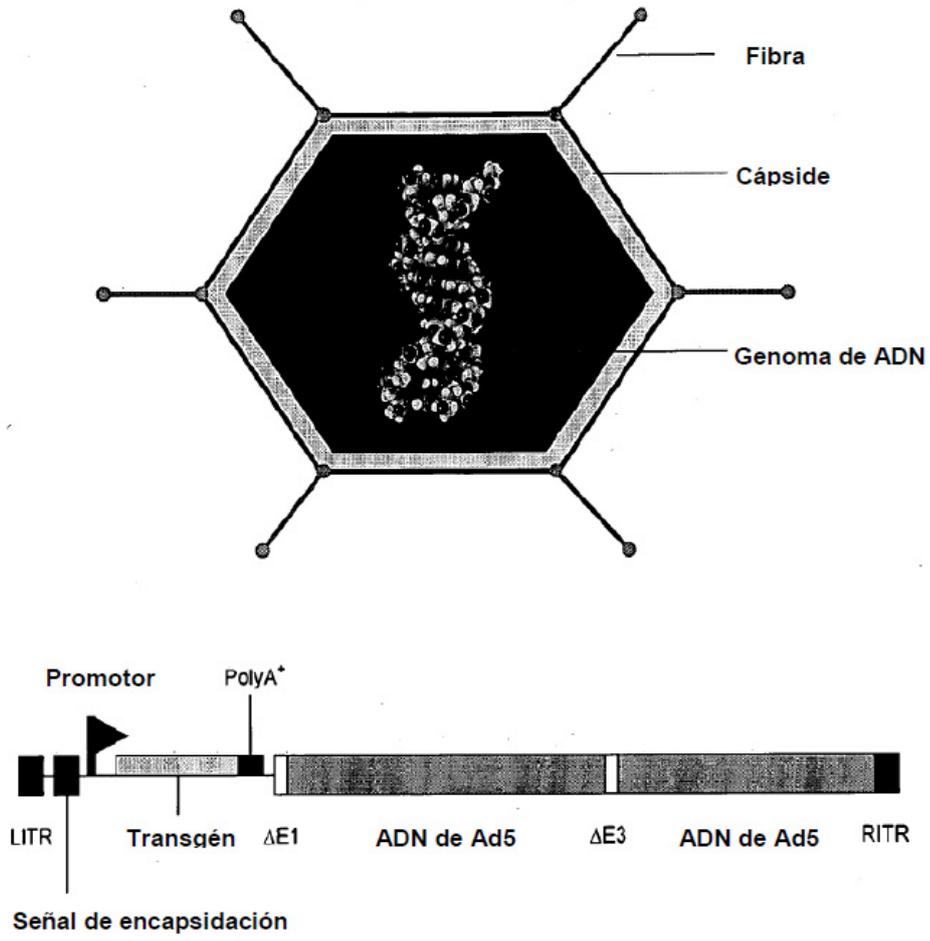


FIG. 9

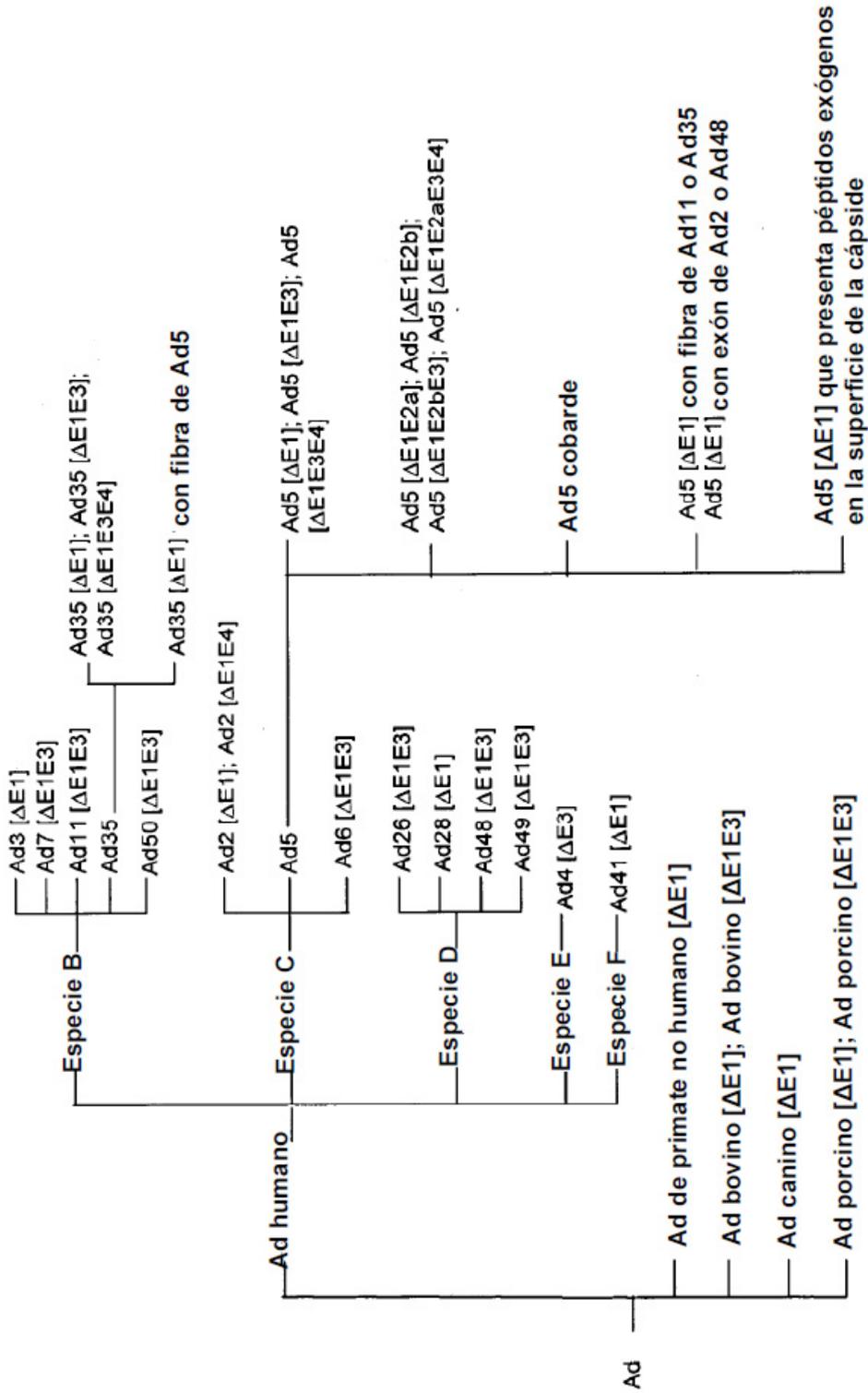


FIG. 10

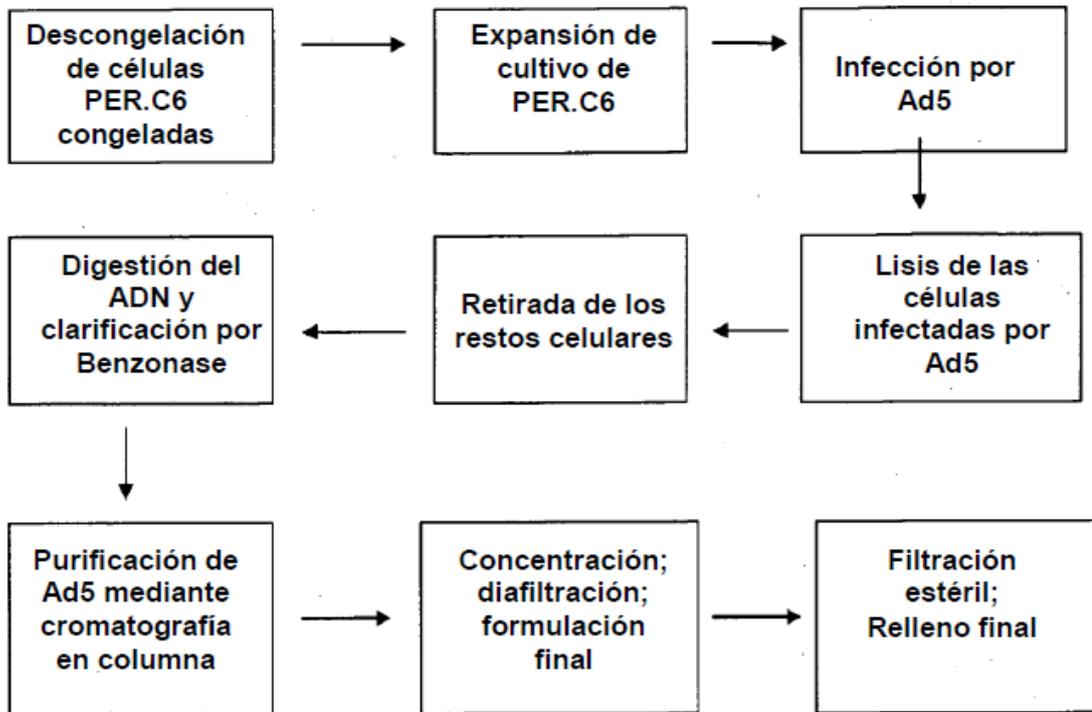


FIG. 11

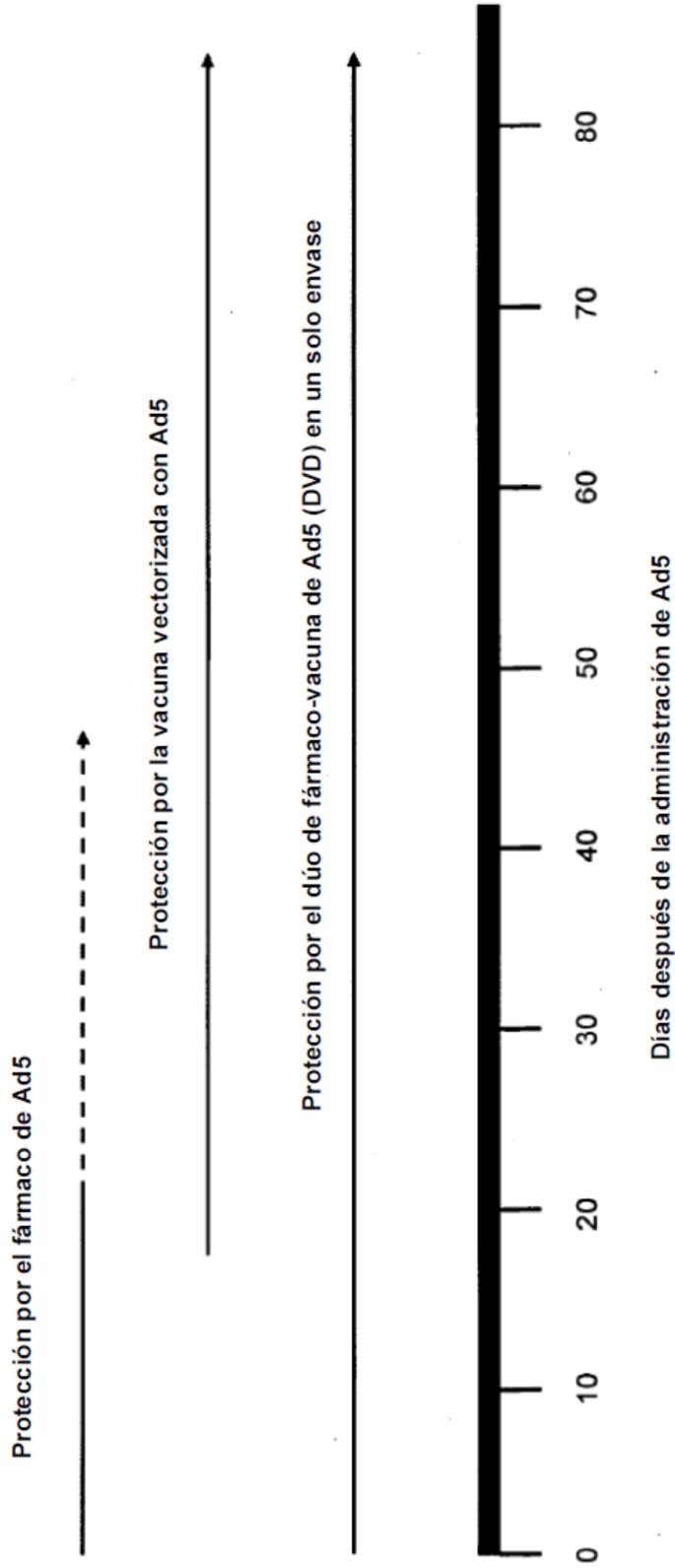


FIG. 12

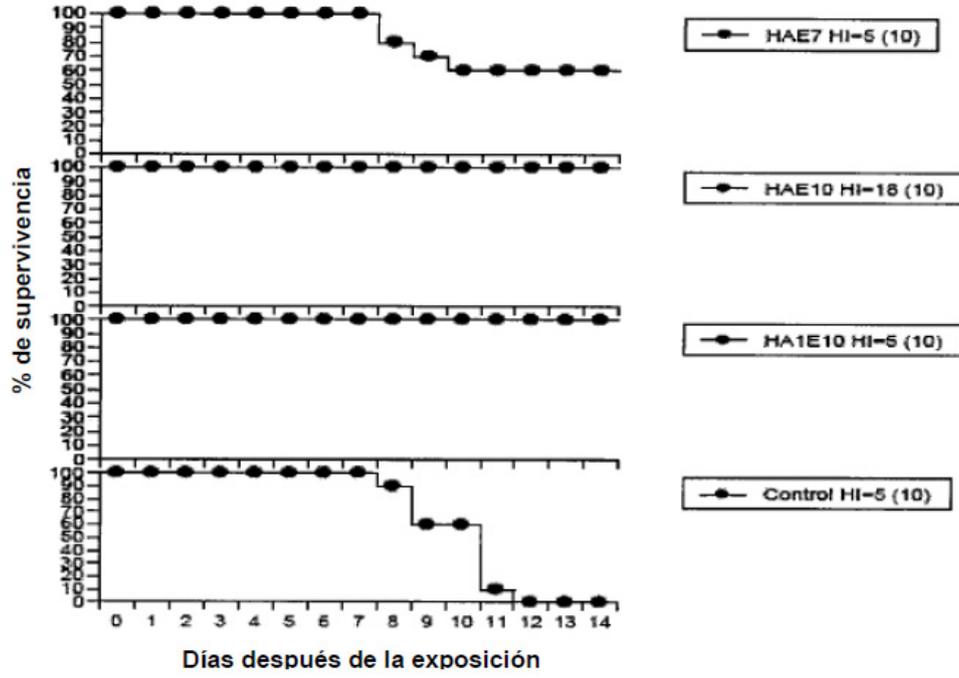


FIG. 13

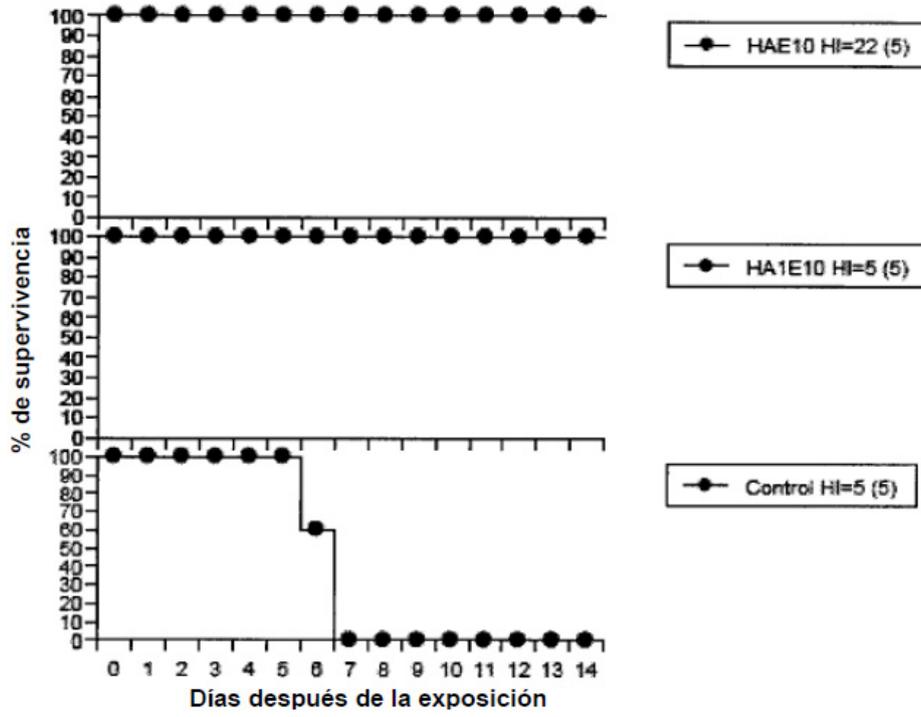


FIG. 14

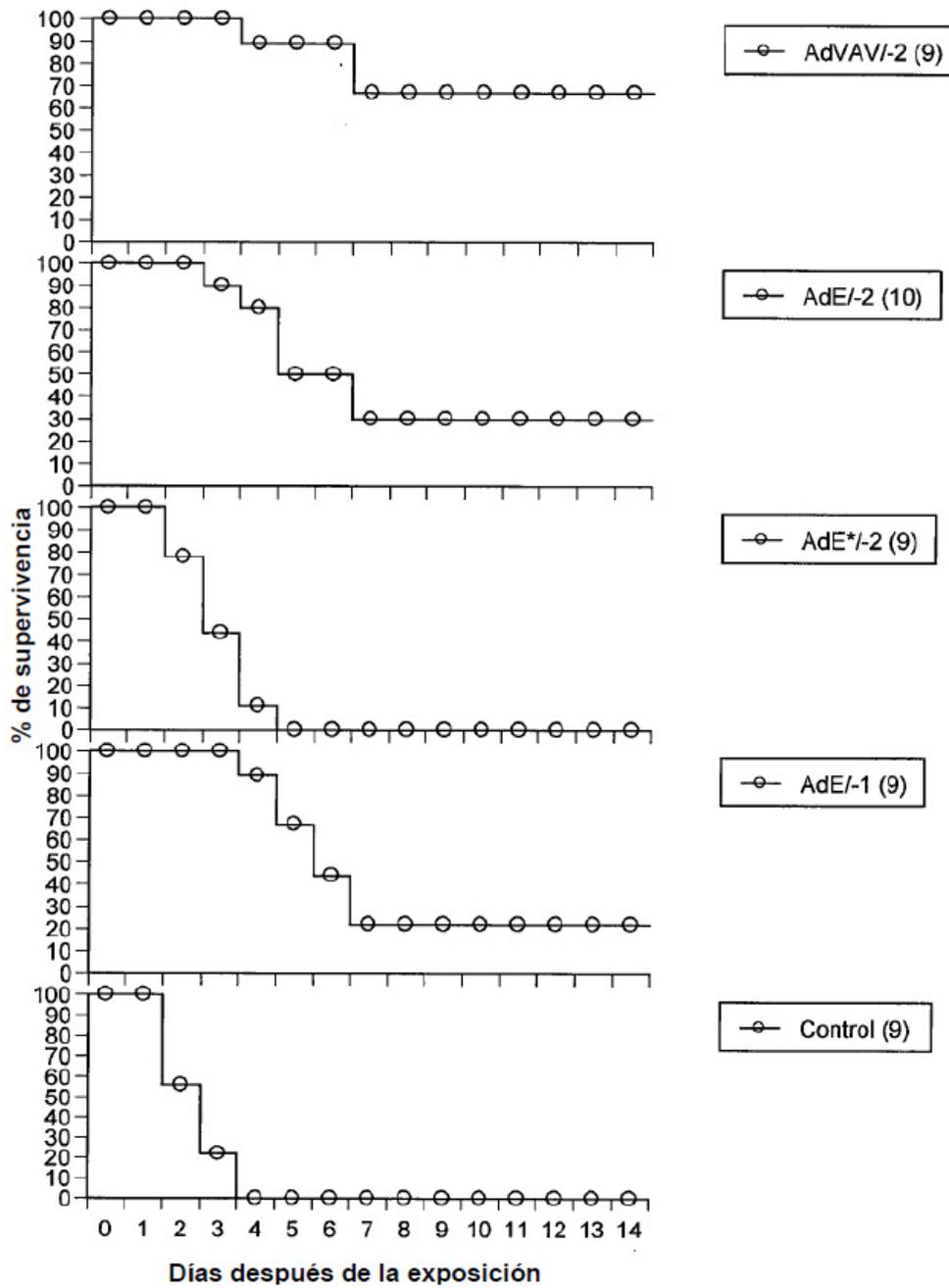
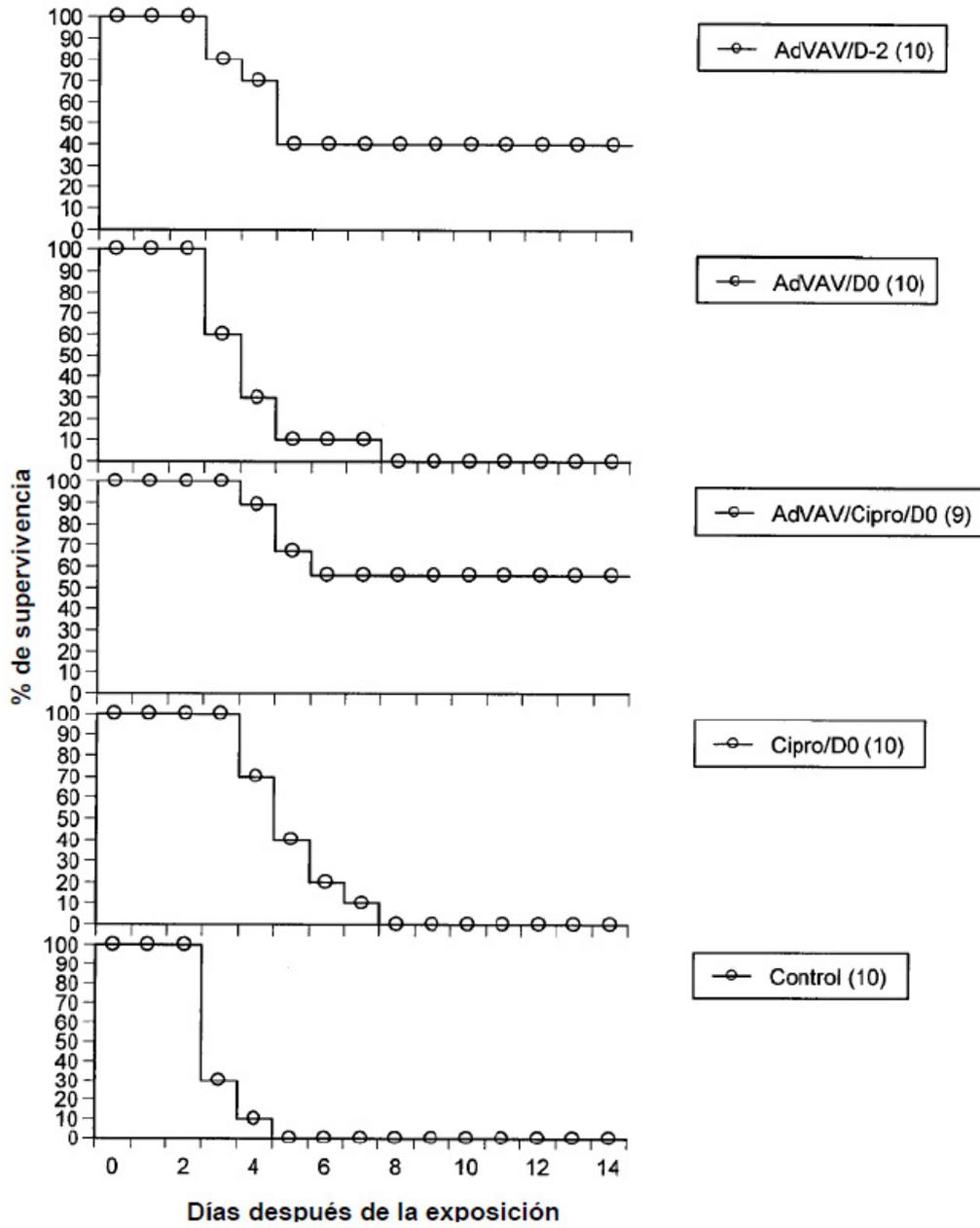


FIG. 15



**FIG. 16**