

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 196**

51 Int. Cl.:

**C12N 7/01** (2006.01)

**A61K 39/12** (2006.01)

**A61K 39/235** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**C07K 14/005** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.12.2011 PCT/US2011/064944**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.06.2012 WO12082918**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2011 E 11849865 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.05.2018 EP 2655604**

54 Título: **Vacunas contra filovirus de adenovirus de serotipo 25 y serotipo 35**

30 Prioridad:

**14.12.2010 US 422954 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**17.07.2018**

73 Titular/es:

**THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (50.0%)**  
**Office of Technology Transfer 6011 Executive Boulevard, Suite 325**  
**Rockville, Maryland 20852, US y**  
**JANSSEN VACCINES & PREVENTION B.V. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SULLIVAN, NANCY J.;**  
**NABEL, GARY J.;**  
**ASIEDU, CLEMENT;**  
**CHENG, CHENG;**  
**PAU, MARIA GRAZIA y**  
**GOUDSMIT, JAAP**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

### Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 676 196 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

Vacunas contra filovirus de adenovirus de serotipo 25 y serotipo 35

## 5 Campo de la invención

Esta invención se refiere a vectores adenovirales para inducir inmunidad protectora contra la infección por filovirus.

## Antecedentes de la invención

10 Los vectores de adenovirus de replicación deficiente (rAd) son potentes inductores de respuestas inmunitarias celulares y, por lo tanto, han llegado a servir como vectores útiles para vacunas a base de genes particularmente para lentivirus y filovirus, así como otros patógenos no virales (Shiver, *et al.*, (2002) *Nature* 415(6869): 331-5; (Hill, *et al.*, *Hum Vaccin* 6(1): 78-83.; Sullivan, *et al.*, (2000) *Nature* 408(6812): 605-9; Sullivan *et al.*, (2003) *Nature* 424(6949): 681-4; Sullivan, *et al.*, (2006) *PLoS Med* 3(6): e177; Radošević, *et al.*, (2007); Santra, *et al.*, (2009) *Vaccine* 27(42): 5837-45. Las vacunas a base de adenovirus tienen varias ventajas como vacunas humanas ya que pueden producirse con títulos elevados en condiciones de BPF y han demostrado ser seguras e inmunogénas en humanos (Asmuth, *et al.*, *J Infect Dis* 201(1): 132-41; Kibuuka, *et al.*, *J Infect Dis* 201(4): 600-7; Koup, *et al.*, *PLoS One* 5(2): e9015.; Catanzaro, *et al.*, (2006) *J Infect Dis* 194(12): 1638-49; Harro, *et al.*, (2009) *Clin Vaccine Immunol* 16(9): 1285-92. Si bien la mayoría del desarrollo inicial de la vacuna se realizó utilizando rAd5 debido a su significativa potencia para provocar respuestas amplias de anticuerpos y de linfocitos T CD8+, la inmunidad preexistente a rAd5 en humanos puede limitar la eficacia (Catanzaro, (2006); Cheng, *et al.*, (2007) *PLoS Pathog* 3(2): e25.; McCoy, *et al.*, (2007) *J Virol* 81(12): 6594-604.; Buchbinder, *et al.*, (2008) *Lancet* 372(9653): 1881-93). Esta propiedad podría restringir el uso de rAd5 en aplicaciones clínicas para muchas vacunas que se encuentran actualmente en desarrollo, incluidas las vacunas contra el virus del Ébola y (EBOV) y el virus de Marburgo (MARV).

Para eludir el problema de la inmunidad preexistente a rAd5, actualmente se están investigando varios vectores alternativos. Estos incluyen vectores adenovirales derivados de serotipos humanos raros y vectores derivados de otros animales como los chimpancés (Vogels, *et al.*, (2003) *J Virol* 77 (15):8263-71; Abbink, *et al.*, (2007) *J Virol* 81:4654-63; Santra, (2009)). La investigación sobre el uso de vectores adenovirales derivados de animales es relativamente incipiente, mientras que los adenovirus humanos poseen las ventajas de tener una biología y tropismo bien caracterizados en las células humanas, así como una capacidad de fabricación documentada (Vogels, *et al.*, (2007) *J Gen Virol* 88 (Pt 11):2915-24). La inmunogenicidad de estos vectores y su potencial como vacunas se ha demostrado en modelos animales, principalmente como combinaciones de sensibilización-refuerzo con vectores heterólogos (Abbink, *et al.*, 2007; Shott *et al.*, (2008) *Vaccine* 26:2818-23).

Las frecuencias de seroprevalencia de adenovirus dependen de la cohorte (Mast, *et al.*, (2010) *Vaccine* 28 (4):950-7) pero entre un gran grupo de 51 adenovirus humanos probados, Ad35 y Ad11 fueron los más raramente neutralizados por sueros de 6 ubicaciones geográficas (Vogels, *et al.*, 2003). Las vacunas a base de rAd35 han demostrado ser inmunogénas en ratones, primates no humanos y humanos, y son capaces de eludir la inmunidad frente a Ad5 (Barouch, *et al.*, (2004) *J Immunol* 172(10): 6290-7; Nanda, *et al.*, (2005) *J Virol* 79(22): 14161-8; Ophorst, *et al.*, (2006) *Infect Immun* 74(1): 313-20; Thorner, *et al.*, (2006) *J Virol* 80(24): 12009-16.; Rodriguez, *et al.*, (2009) *Vaccine* 27(44): 6226-33). Los vectores rAd35 se obtienen en títulos elevados en líneas celulares adecuadas para la producción de vacunas de grado clínico (Havenga, *et al.*, (2006) *J Gen Virol* 87 (Pt 8):2135-43), y se han formulado para inyección y polvo inhalable estable (Jin, *et al.*, *Vaccine* 28 (27):4369-75). Estos vectores muestran una transducción eficiente de células dendríticas humanas (de Gruijl, *et al.*, (2006) *J Immunol* 177(4): 2208-15; Lore, *et al.*, (2007) *J Immunol* 179(3): 1721-9), y por lo tanto tienen la capacidad de mediar en la administración y presentación de un alto nivel de antígenos. Ad26, del subgrupo D, es otro adenovirus seleccionado por su capacidad para eludir la inmunidad preexistente frente a Ad5. Aunque la seroprevalencia de Ad26 puede ser significativa en cierta población adulta, los títulos de anticuerpos neutralizantes de Ad26 permanecen notablemente más bajos que los títulos de anticuerpos neutralizantes de Ad5 (Abbink, *et al.*, 2007; Mast, *et al.*, 2010). Los estudios han demostrado que rAd26 se puede obtener en títulos altos en líneas celulares que complementan al Ad5 E1 adecuadas para la fabricación de estos vectores a gran escala y con calidad clínica (Abbink, *et al.*, 2007), y se ha demostrado que este vector induce respuestas inmunitarias humorales y mediadas por células en las estrategias de vacunación de sensibilización-refuerzo (Abbink, *et al.*, 2007; Liu, *et al.*, (2009) *Nature* 457 (7225):87-91).

## Breve resumen de la invención

La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que los vectores rAd35 y rAd26 tras la administración como combinaciones heterólogas sensibilización-refuerzo generan respuestas inmunitarias protectoras contra la infección por filovirus.

La presente invención proporciona así un primer y segundo vectores de adenovirus recombinantes que comprende cada uno un ácido nucleico que codifica una proteína antigénica de filovirus, en el que el primer vector de adenovirus comprende una proteína de la cápside del adenovirus 26 y en el que el segundo vector de adenovirus comprende una proteína de la cápside del adenovirus 35, para su uso en la inducción de una respuesta inmunitaria en un sujeto

contra dicho antígeno de filovirus, administrando al sujeto, como vacunación de sensibilización, una cantidad inmunológicamente eficaz de dicho primer vector de adenovirus recombinante; seguido de la administración a dicho sujeto, como una vacuna de refuerzo, de una cantidad inmunológicamente eficaz de dicho segundo vector de adenovirus, en el que las proteínas antigénicas de filovirus codificadas por el primer y segundo vectores de adenovirus recombinantes comparten al menos un determinante antigénico. El vector de adenovirus generalmente es de replicación deficiente.

La proteína antigénica de los filovirus suele ser una glucoproteína de un virus del Ébola o de un virus de Marburgo. El virus del Ébola puede ser de cualquier especie, por ejemplo, Zaire o Sudán/Gulu. Los ácidos nucleicos ilustrativos que codifican antígenos de filovirus adecuados se muestran en la SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2.

La invención también proporciona moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican los vectores de adenovirus recombinantes de la invención. Los ácidos nucleicos generalmente comprenden un casete de expresión que comprende un promotor de CMV unido operativamente a una secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína antigénica de filovirus. La secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína antigénica de filovirus puede ser la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:2.

La invención proporciona además composiciones inmunogénas que comprenden los vectores de adenovirus aislados de la invención. La composición inmunogénica puede comprender además un adyuvante.

También se proporcionan métodos para inducir una respuesta inmunitaria contra un antígeno de filovirus en un paciente. Los métodos comprenden administrar al paciente una cantidad inmunológicamente eficaz del vector de adenovirus de la invención. Habitualmente, el vector de adenovirus se administra por vía intramuscular.

En algunas realizaciones, los vectores se administran como una vacunación de sensibilización seguida de una vacunación de refuerzo. Por ejemplo, la sensibilización puede ser una administración de un vector de adenovirus que comprende una proteína de la cápside del adenovirus 26 y el refuerzo puede ser una administración de un vector de adenovirus que comprende una proteína de la cápside del adenovirus 35.

#### Definiciones

Una "proteína de la cápside del adenovirus" se refiere a una proteína en la cápside de un adenovirus (por ejemplo, Ad 26 o Ad 35) que está implicada en la determinación del serotipo y/o tropismo de un adenovirus particular. Las proteínas de la cápside adenovirales incluyen generalmente las proteínas de la fibra, del pentón y/o del hexón. Como se usa en la presente memoria, una "proteína de la cápside de Ad26" o una "proteína de la cápside de Ad35" puede ser, por ejemplo, una proteína de la cápside quimérica que incluye al menos una parte de una proteína de la cápside de Ad26 o Ad35. En ciertas realizaciones, la proteína de la cápside es una proteína de la cápside completa de Ad26 o de Ad35. En ciertas realizaciones, el hexón, el pentón y la fibra son de Ad26 o de Ad35.

Los términos "adyuvante" e "inmunoestimulante" se usan indistintamente en la presente memoria y se definen como una o más sustancias que provocan la estimulación del sistema inmunitario. En este contexto, se usa un adyuvante para potenciar una respuesta inmunitaria a los vectores de adenovirus de la invención.

El término "correspondiente a", cuando se aplica a posiciones de restos de aminoácidos en secuencias, significa posiciones correspondientes en una pluralidad de secuencias cuando las secuencias están óptimamente alineadas.

Los términos "idéntico" o porcentaje de "identidad", en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas, (p.ej., las proteínas de la cápside del adenovirus de la invención y los polinucleótidos que las codifican) se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de restos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales, cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima, medido usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante inspección visual.

Una molécula de ácido nucleico "aislada" o vector de adenovirus es una molécula de ácido nucleico (p.ej., ADN o ARN) o virus, que se ha eliminado de su entorno nativo. Por ejemplo, las moléculas de ADN recombinante contenidas en un vector se consideran aisladas para los fines de la presente invención. Otros ejemplos de moléculas de ADN aisladas incluyen moléculas de ADN recombinante mantenidas en células hospedadoras heterólogas o moléculas de ADN purificadas (parcial o sustancialmente) en solución. Las moléculas de ARN aisladas incluyen transcritos de ARN *in vivo* o *in vitro* de las moléculas de ADN de la presente invención. Las moléculas de ácido nucleico aisladas de acuerdo con la presente invención incluyen además tales moléculas producidas sintéticamente.

"Unido operativamente" indica que dos o más segmentos de ADN están unidos entre sí de manera que funcionan conjuntamente para los fines previstos. Por ejemplo, las secuencias codificantes están unidas operativamente al promotor en el marco de lectura correcto de modo que la transcripción se inicia en el promotor y pasa a través del segmento o segmentos de codificación al terminador.

Un “polinucleótido” es un polímero monocatenario o bicatenario de bases de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos generalmente leídas desde el extremo 5' al 3'. Los polinucleótidos incluyen ARN y ADN, y pueden aislarse a partir de fuentes naturales, sintetizarse *in vitro* o prepararse a partir de una combinación de moléculas naturales y sintéticas. Cuando el término se aplica a moléculas bicatenarias, se usa para indicar la longitud total y se entenderá que es equivalente a la expresión “pares de bases”.

Un “polipéptido” es un polímero de restos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, producidos de forma natural o sintética. Los polipéptidos de menos de aproximadamente 50 restos de aminoácidos se denominan comúnmente “oligopéptidos”.

El término “promotor” se usa en la presente memoria por su significado reconocido en la técnica para indicar una porción de un gen que contiene secuencias de ADN que proporcionan la unión de la ARN polimerasa y el inicio de la transcripción de una secuencia codificante unida operativamente. Las secuencias promotoras se encuentran generalmente en las regiones 5' no codificantes de los genes.

Una “proteína” es una macromolécula que comprende una o más cadenas polipeptídicas. Una proteína también puede comprender componentes no peptídicos, tales como grupos carbohidrato. Los carbohidratos y otros sustituyentes no peptídicos se pueden añadir a una proteína mediante la célula en la que se produce la proteína, y variarán con el tipo de célula. Las proteínas se definen en la presente memoria en términos de sus estructuras principales de aminoácidos; los sustituyentes tales como los grupos carbohidrato generalmente no se especifican, pero pueden estar presentes de todos modos.

La frase “sustancialmente idéntica”, en el contexto de dos ácidos nucleicos o polipéptidos de la invención (p.ej., proteínas de la cápside del adenovirus o antígenos de filovirus), se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen al menos 60 %, más preferiblemente 65 %, incluso más preferiblemente 70 %, aún más preferiblemente 75 %, incluso más preferiblemente 80 %, y lo más preferiblemente 90-95 % de identidad de nucleótidos o de restos de aminoácidos, cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima, como se mide usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencia o por inspección visual. Preferiblemente, la identidad sustancial existe a lo largo de una región de las secuencias que tiene al menos aproximadamente 50 restos de longitud, más preferiblemente a lo largo de una región de al menos aproximadamente 100 restos, y lo más preferiblemente las secuencias son sustancialmente idénticas en al menos aproximadamente 150 restos. En una realización más preferida, las secuencias son sustancialmente idénticas en toda la longitud de las regiones de codificación.

Para la comparación de secuencias, generalmente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, con la cual se comparan las secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de subsecuencia, si es necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencia. El algoritmo de comparación de secuencia calcula a continuación el porcentaje de identidad de secuencia para la secuencia o secuencias de prueba con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa designados.

La alineación óptima de secuencias para la comparación se puede realizar, p.ej., con el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), con el algoritmo de alineación de homología de Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), mediante la búsqueda con el método de similitud de Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988)), mediante implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección visual (ver en general, Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel *et al.*, eds., Current Protocols, una empresa conjunta entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., (Suplemento 1995) (Ausubell)).

Ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul *et al.*, (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 y Altschul *et al.*, (1977) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, respectivamente. El software para realizar el análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica. Este algoritmo implica identificar primero pares de secuencias de puntuación alta (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que coinciden o satisfacen alguna puntuación umbral de valores positivos T cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se conoce como el umbral de puntuación de palabras vecinas (Altschul *et al.*, *supra*). Estas coincidencias de palabra de vecindad iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largas que las contienen. Estas coincidencias de palabras se extienden luego en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia siempre que se pueda aumentar la puntuación de alineación acumulada. Las puntuaciones acumuladas se calculan utilizando, para las secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de restos coincidentes, siempre > 0) y N (puntuación de penalización para restos que no coinciden, siempre < 0). Para las secuencias de aminoácidos, se usa una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulada. La extensión de las coincidencias de palabra en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineación acumulada disminuye en la cantidad X desde su

valor máximo alcanzado; la puntuación acumulada llega a cero o menos, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de restos de puntuación negativa; o se llega al final de cualquiera de las secuencias. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) utiliza como valores por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M = 5, N = -4, y una comparación de ambas cadenas. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza como valores por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10 y la matriz de puntuación BLOSUM62 (ver Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)).

Además de calcular el porcentaje de identidad de secuencia, el algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (ver, por ejemplo., Karlin & Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 (1993)). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos ocurriría por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de prueba con el ácido nucleico de referencia es menor que aproximadamente 0,1, más preferiblemente menor que aproximadamente 0,01, y lo más preferiblemente menor que aproximadamente 0,001.

Una indicación adicional de que dos secuencias de ácido nucleico o polipéptidos de la invención son sustancialmente idénticas es que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico es reactivo inmunológicamente de forma cruzada con el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico, como se describe a continuación. De este modo, un polipéptido es generalmente sustancialmente idéntico a un segundo de polipéptido, por ejemplo, donde los dos péptidos difieren solo por sustituciones conservativas. Otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas se hibridan entre sí en condiciones rigurosas, como se describe a continuación.

El término "sustancialmente similar" en el contexto de las proteínas de la cápside o antígenos de filovirus de la invención indica que un polipéptido comprende una secuencia con al menos 90 %, preferiblemente al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de referencia en una ventana de comparación de 10-20 aminoácidos. El porcentaje de identidad de secuencia se determina comparando dos secuencias óptimamente alineadas sobre una ventana de comparación, en la que la porción de la secuencia de polinucleótidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para la alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que la base de ácido nucleico o resto de aminoácido idéntico se produce en ambas secuencias para obtener el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia.

#### Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Agrupación genética de adenovirus y organización de vectores. (A) Árbol filogenético que muestra la relación de las secuencias de hexón del adenovirus. Los diferentes subgrupos A hasta F están indicados y los serotipos de adenovirus humano 26 y 35 están resaltados. El árbol se construyó utilizando el método de unión de vecinos del paquete ClustalX (Larkin *et al.*, 2007) y se dibujó utilizando el paquete Phylip Phylogeny Inference versión 3.68. Los valores de confianza se muestran en las ramas internas como un porcentaje de 1000 veces de remuestreo con reemplazo (bootstrap). (B) Descripción esquemática del genoma de los vectores Ad26 recombinante y Ad35 recombinante. Ambos vectores tienen una delección completa de E1 y contienen un casete de expresión que contiene el gen de la glucoproteína del EBOV bajo el control del promotor de CMV. Se realizaron deleciones adicionales en las regiones E3 y las secuencias respectivas de E4 orf6 se reemplazaron por las secuencias E4orf6 de Ad5 para facilitar la replicación de estos vectores de vacuna en líneas celulares complementarias de Ad5 E1, tales como células PER.C6®.

Figura 2. Respuestas inmunitarias inducidas por la vacuna frente a rAd35-GP (utilizando Ad35BSU.Ebo.GP(Z)FL.wt) y exposición al EBOV. (A) La cantidad de IgG anti-GP EBOV en muestras de plasma obtenidas 3 semanas después de la vacunación de macacos cinomolgos vacunados con rAd35-GP, no expuestos Ad5 (barras grises) e inmunes a Ad5 (barras negras), determinados mediante ELISA. Los títulos de anticuerpos EC90 se determinaron como se describe en Métodos. (B, C) Frecuencia de las respuestas de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> específicas del antígeno enumeradas en los subconjuntos de linfocitos de memoria por ICS para IL-2 (CD4) o TNF- $\alpha$  (CD8), y análisis por citometría de flujo después de la estimulación de las PBMC 3 semanas después de la vacuna. (D) Niveles plasmáticos de la enzima hepática AST en macacos vacunados con rAd35-GP (azul, no expuestos a Ad5, rojo, inmunes a Ad5) y control (negro) después de la exposición infecciosa con 1000 UFP de ZEBOV.

Figura 3. Respuesta a la dosis para la inducción con rAd35-GP de respuestas inmunitarias en macacos (usando Ad35BSU.Ebo.GP(Z) FL.wt y Ad35BSU.Ebo.GP(S/G)FL). (A) Títulos de anticuerpos IgG por ELISA específicos de GP (EC90) en plasma obtenido de macacos 3 semanas después de la vacunación con 10<sup>10</sup> o 10<sup>11</sup> partículas de virus de cada uno de los vectores rAd35-GP (Ad35BSU.Ebo.GP(Z)FL.wt y Ad35BSU.Ebo.GP(S/G)FL). (B, C)

Frecuencias de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> evaluadas por ICS como en la Figura 2. Barras grises, 10<sup>10</sup> partículas de virus de rAd35-GP; barras negras, 10<sup>11</sup> partículas de virus de rAd35-GP. (D, E) Niveles plasmáticos de la enzima hepática AST después de la exposición con 1000 UFP de ZEBOV. Azul, 10<sup>10</sup> partículas de virus de rAd35-GP; rojo, 10<sup>11</sup> partículas de virus rAd35-GP y negro, control.

Figura 4. Capacidad de los vectores rAd26-GP para inducir anticuerpos específicos de antígeno y respuestas de linfocitos T en macacos cinomolgos (usando Ad26.Ebo.GP(Z)FL.wt y Ad26.Ebo.GP(S/G)FL.wt) (A) Títulos de anticuerpos IgG por ELISA (EC90) y (B, C) frecuencias de linfocitos T CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> específicos de GP, (D) Los niveles plasmáticos de la enzima hepática AST se muestran para macacos cinomolgos individuales en dos estudios diferentes. Los sujetos del estudio 1 recibieron una dosis de vacuna de 10<sup>10</sup> o 10<sup>11</sup> partículas de virus de rAd26 de cada uno de los vectores rAd26-GP (Ad26.Ebo.GP(Z)FL.wt y Ad26.Ebo.GP(S/G)FL.wt) y los sujetos del Estudio 2 recibieron una dosis de 10<sup>12</sup> partículas de virus de cada uno de los vectores rAd26-GP (Ad26.Ebo.GP(Z)FL.wt y Ad26.Ebo.GP(S/G)FL.wt).

Figura 5. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para macacos vacunados con rAd26-GP (usando Ad26.Ebo.GP(Z)FL.wt y Ad26.Ebo.GP(S/G)FL.wt). El control no vacunado y los animales vacunados con rAd26-GP se infectaron cuatro semanas después de la vacunación con 1000 UFP de ZEBOV en dos experimentos de exposición diferentes como se muestra en la Figura 4. Panel A: las líneas negras muestran sujetos no vacunados y las líneas azul oscuro muestran sujetos vacunados con Ad26 con las dosis indicadas. Panel B: un grupo de sujetos vacunados con rAd35 (azul claro) se muestra para la comparación de potencia con Ad26 a una dosis de 10<sup>11</sup> partículas de virus de cada uno de los vectores rAd26-GP (Ad26.Ebo.GP(Z)FL.wt y Ad26.Ebo.GP(S/G)FL.wt). Panel C: supervivencia histórica del macaco vacunado con Ad5 (rojo) en comparación con los sujetos vacunados con 10<sup>12</sup> partículas de virus de cada uno de los vectores rAd26-GP (Ad26.Ebo.GP(Z)FL.wt y Ad26.Ebo.GP(S/G)FL.wt).

Figura 6. Comparación de las respuestas inmunitarias de sensibilización y refuerzo después de las vacunaciones con rAd26-GP/rAd35-GP (usando Ad26.Ebo.GP(Z)FL.wt y Ad26.Ebo.GP(S/G)FL.wt seguido de Ad35BSU.Ebo.GP(Z)FL.wt y Ad35BSU.Ebo.GP(S/G)FL). (A) La cantidad de IgG anti-GP EBOV en muestras de plasma obtenidas 3 semanas después de la vacunación de macacos cinomolgos vacunados con rAd35-GP, no expuestos a Ad5 (barras grises) e inmunes a Ad5 (barras negras), rAd35-GP determinado mediante ELISA. Los títulos de anticuerpos EC90 se determinaron como se describe en Métodos. (B, C) Frecuencia de respuestas de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> específicos de antígeno enumeradas en los subconjuntos de linfocitos de memoria por ICS para IL-2 (CD4) o TNF- $\alpha$  (CD8), y análisis por citometría de flujo después de la estimulación de las PBMC 3 semanas después de la vacuna. (D, E) Resultados de la exposición a EBOV. Niveles plasmáticos de la enzima hepática AST (D) y curva de supervivencia de Kaplan-Meier (E) para macacos vacunados con rAd26-GP/rAd35-GP después de la exposición infecciosa con 1000 UFP de ZEBOV (azul, rAd26-GP/rAd35-GP; rojo, Ad5- GP y negro, control no vacunado).

#### Descripción detallada

La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que los vectores rAd35 y rAd26 en una sola inoculación, así como las combinaciones heterólogas sensibilización-refuerzo, generan respuestas inmunitarias protectoras contra la infección por filovirus. En particular, la presente invención proporciona evidencia de que las combinaciones heterólogas de sensibilización-refuerzo (en particular, sensibilización con Ad26 seguido de refuerzo con Ad35) son sorprendentemente eficaces para generar respuestas inmunitarias protectoras. La sorprendente efectividad de estas combinaciones de sensibilización-refuerzo no pudo haber sido predicha en el momento de la invención. Por lo tanto, la presente invención proporciona vectores adenovirales recombinantes (rAd35 o rAd26) que expresan antígenos de filovirus. Los vectores adenovirales pueden formularse como vacunas y usarse para inducir inmunidad protectora contra infecciones por filovirus, ya sea solos o en combinaciones de sensibilización-refuerzo.

#### ANTIGENOS DE FILOVIRUS

El virus del Ébola y el virus de Marburgo relacionado genéticamente son filovirus asociados con brotes de fiebre hemorrágica altamente letal en humanos y primates en América del Norte, Europa y África (Peters, C.J. *et al.*, en: Fields Virology, eds. Fields, B.N. *et al.*, 1161-1176, Philadelphia, Lippincott-Raven, 1996; Peters, C.J. *et al.*, 1994 Semin Virol 5:147-154). Aunque se han definido varios subtipos, la organización genética de estos virus es similar, conteniendo cada uno siete genes alineados linealmente. Entre las proteínas virales, la glucoproteína de la envuelta existe en dos formas alternativas, una proteína secretada de 50-70 kilodalton (kDa) (sGP) y una glucoproteína transmembrana de 130 kDa (GP) generada por la edición de ARN que media la entrada del virus (Peters, C.J. *et al.*, en: Fields Virology, eds. Fields, B.N. *et al.* 1161-1176, Philadelphia, Lippincott-Raven, 1996; Sanchez, A. *et al.* 1996 PNAS USA 93:3602-3607). Otros productos génicos estructurales incluyen la nucleoproteína (NP), las proteínas de matriz VP24 y VP40, las supuestas proteínas no estructurales VP30 y VP35, y la polimerasa viral (revisado en Peters, C.J. *et al.* en: Fields Virology, eds. Fields, B.N. *et al.*, 1161-1176, Philadelphia, Lippincott-Raven, 1996).

Las moléculas de ácido nucleico pueden codificar productos génicos estructurales de cualquier especie de filovirus. Hay cinco especies de virus del Ébola, Zaire (especie tipo, también denominada en la presente memoria ZEBOV), Sudán (también denominada en la presente memoria SEBOV), Reston, Bundibugyo y Costa de Marfil. Existe una sola especie del virus de Marburgo (también denominado en la presente memoria MARV).

El antígeno particular expresado en los vectores de la invención no es un aspecto crítico de la presente invención. Los vectores adenovirales de la invención se pueden usar para expresar proteínas que comprenden un determinante antigénico de una amplia variedad de antígenos de filovirus. En una realización típica y preferida, los vectores de la invención incluyen ácido nucleico que codifica la forma transmembrana de la glucoproteína viral (GP). En otras realizaciones, los vectores de la invención pueden codificar la forma secretada de la glucoproteína viral (SGP) o la nucleoproteína viral (NP).

Un experto reconocerá que las moléculas de ácido nucleico que codifican la proteína antigénica de filovirus pueden modificarse, por ejemplo, las moléculas de ácido nucleico expuestas en la presente memoria pueden mutarse, siempre que la proteína expresada modificada provoque una respuesta inmunitaria contra un patógeno o enfermedad. Por lo tanto, como se usa en la presente memoria, la expresión “proteína antigénica de filovirus” se refiere a una proteína que comprende al menos un determinante antigénico de una proteína de filovirus descrita anteriormente. El término abarca antígenos de filovirus (es decir., productos génicos de un filovirus), así como proteínas recombinantes que comprenden uno o más determinantes antigénicos de filovirus.

En algunas realizaciones, la proteína puede mutarse de modo que sea menos tóxica para las células (ver p.ej., el documento WO/2006/037038). La presente invención también incluye vacunas que comprenden una combinación de moléculas de ácido nucleico. Por ejemplo, y sin limitación, las moléculas de ácido nucleico que codifican GP, SGP y NP de las cepas del Ébola de Zaire, Sudán y Costa de Marfil pueden combinarse en cualquier combinación, en una composición de vacuna.

#### VECTORES ADENOVIRALES

Como se ha señalado anteriormente, la exposición a ciertos adenovirus ha dado como resultado respuestas inmunitarias contra ciertos serotipos de adenovirus, que pueden afectar a la eficacia de las vacunas adenovirales. La presente invención proporciona vectores adenovirales que comprenden proteínas de la cápside de dos serotipos raros: Ad26 y Ad35. En la realización típica, el vector es un virus rAd26 o rAd35.

Por lo tanto, los vectores de la invención comprenden una proteína de la cápside de Ad26 o Ad35 (p.ej., una proteína de la fibra, del pentón o del hexón). Un experto reconocerá que no es necesario que se use una proteína de la cápside de Ad26 o Ad35 completa en los vectores de la invención. Por lo tanto, en los vectores de la invención pueden usarse proteínas quiméricas de la cápside que incluyen al menos una parte de una proteína de la cápside de Ad26 o Ad35. Los vectores de la invención también pueden comprender proteínas de la cápside en las que las proteínas de la fibra, del pentón y del hexón derivan cada una de un serotipo diferente, siempre que al menos una proteína de la cápside se derive de Ad26 o Ad35. En realizaciones preferidas, las proteínas de la fibra, del pentón y del hexón se derivan cada una de Ad26 o cada una de Ad35.

Un experto reconocerá que los elementos derivados de serotipos múltiples se pueden combinar en un solo vector de adenovirus recombinante. Por lo tanto, se puede producir un adenovirus quimérico que combina propiedades deseables de diferentes serotipos. Por lo tanto, en algunas realizaciones, un adenovirus quimérico de la invención podría combinar la ausencia de inmunidad preexistente de los serotipos Ad26 y Ad35 con características tales como estabilidad frente a la temperatura, ensamblaje, anclaje, rendimiento de producción, infección redirigida o mejorada, estabilidad del ADN en la célula objetivo, y similares.

En ciertas realizaciones, el vector de adenovirus recombinante de la invención se deriva principal o completamente de Ad35 o de Ad26 (es decir, el vector es rAd35 o rAd26). En algunas realizaciones, el adenovirus es de replicación deficiente, p.ej., porque contiene una delección en la región E1 del genoma. Para los adenovirus de la invención, derivados de Ad26 o Ad35, es típico intercambiar la secuencia codificante de E4-orf6 del adenovirus con la E4-orf6 de un adenovirus del subgrupo C humano tal como Ad5. Esto permite la propagación de dichos adenovirus en líneas celulares complementarias bien conocidas que expresan los genes E1 de Ad5, tales como, por ejemplo, células 293, células PER.C6, y similares (ver, p.ej., Havenga *et al.*, 2006, J Gen Virol 87:2135-43; documento WO 03/104467).

En ciertas realizaciones, el adenovirus es un adenovirus humano de serotipo 35, con una delección en la región E1 en la que se ha clonado el ácido nucleico que codifica el antígeno, y con una región E4-orf6 de Ad5. En ciertas realizaciones, el adenovirus es un adenovirus humano de serotipo 26, con una delección en la región E1 en la que se ha clonado el ácido nucleico que codifica el antígeno, y con una región E4-orf6 de Ad5. Para el adenovirus Ad35, es típico retener el extremo 3' del marco de lectura abierto E1B 55K en el adenovirus, por ejemplo, los 166 pb directamente en dirección 5' del marco de lectura abierto pIX o un fragmento que comprende este, tal como un fragmento de 243 pb directamente en dirección 5' del codón de inicio pIX, marcado en el extremo 5' por un sitio de restricción *Bsu*361, ya que esto aumenta la estabilidad del adenovirus porque el promotor del gen pIX reside parcialmente en este área (ver, p.ej., Havenga *et al.*, 2006, *supra*; documento WO 2004/001032).

La preparación de vectores adenovirales recombinantes es bien conocida en la técnica. La preparación de vectores rAd26 se describe, por ejemplo, en el documento WO 2007/104792 y en Abbink et al., (2007) Virol 81(9): 4654-63. Ejemplos de secuencias de genoma de Ad26 se encuentran en GenBank con el número de acceso EF 153474 y en la SEQ ID NO:1 del documento WO 2007/104792. La preparación de vectores rAd35 se describe, por ejemplo, en la patente US-7.270.811 y en Vogels *et al.*, (2003) J Virol 77 (15): 8263-71. Se encuentra una secuencia de genoma ejemplar de Ad35 en GenBank con el número de acceso AC\_000019.

Generalmente, se produce un vector de la invención usando un ácido nucleico que comprende el genoma adenoviral recombinante completo (p.ej., un vector de plásmido, cósmido o baculovirus). Por lo tanto, la invención también proporciona moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican los vectores adenovirales de la invención. Las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden estar en forma de ARN o en forma de ADN obtenido por clonación o producido sintéticamente. El ADN puede ser bicatenario o monocatenario.

Los vectores de adenovirus de la invención son generalmente de replicación deficiente. En estas realizaciones, el virus se vuelve defectuoso para la replicación mediante delección o inactivación de regiones críticas para la replicación del virus, tal como la región E1. Las regiones pueden deleccionarse o inactivarse sustancialmente, por ejemplo, insertando el gen de interés (generalmente vinculado a un promotor). En algunas realizaciones, los vectores de la invención pueden contener delecciones en otras regiones, tales como las regiones E2, E3 o E4 o inserciones de genes heterólogos unidos a un promotor. Para adenovirus mutados en E2 y/o E4, generalmente se usan líneas celulares que complementan E2 y/o E4 para generar adenovirus recombinantes. Las mutaciones en la región E3 del adenovirus no necesitan ser complementadas por la línea celular, ya que no se requiere E3 para la replicación.

Generalmente, se usa una línea celular de empaquetamiento para producir una cantidad suficiente de vectores de adenovirus de la invención. Una célula de empaquetamiento es una célula que comprende los genes que se han eliminado o inactivado en un vector de replicación deficiente, lo que permite que el virus se replique en la célula. Las líneas celulares adecuadas incluyen, por ejemplo, PER.C6, 911, 293 y E1 A549.

Como se indicó anteriormente, se puede expresar una amplia variedad de proteínas antigénicas de filovirus en los vectores de la invención. Si es necesario, el gen heterólogo que codifica la proteína antigénica de filovirus puede optimizarse con codones para asegurar la expresión adecuada en el hospedador tratado (p.ej., humano). La optimización de codones es una tecnología ampliamente aplicada en la técnica. Generalmente, el gen heterólogo se clona en la región E1 y/o E3 del genoma adenovirico.

El gen heterólogo de filovirus puede estar bajo el control de (es decir, unido operativamente a) un promotor derivado de adenovirus (p.ej., el promotor tardío principal) o puede estar bajo el control de un promotor heterólogo. Los ejemplos de promotores heterólogos adecuados incluyen el promotor CMV y el promotor RSV. Preferiblemente, el promotor se localiza en dirección 5' del gen heterólogo de interés dentro de un casete de expresión.

Como se indicó anteriormente, los vectores de adenovirus de la invención pueden comprender una amplia variedad de antígenos de filovirus conocidos por los expertos en materia. La Tabla 1 proporciona un resumen de ejemplos de vectores de la invención.

Tabla 1

| Nombre del vector     | Número VRC del plásmido fuente para inserción | Secuencia de la inserción | Descripción                  |
|-----------------------|-----------------------------------------------|---------------------------|------------------------------|
| Ad5.Ebo.GP(Z)FL.wt    | 6001                                          | SEQ ID NO:1               | GP de ZEBOV tipo silvestre   |
| Ad5.Ebo.GP(S/G)FL.wt  | 6610                                          | SEQ ID NO:3               | GP de SEBOV tipo silvestre   |
| Ad5.Mar.GP(A)FL       | 6712                                          | SEQ ID NO:4               | MARV Angola codón optimizado |
| Ad26.Ebo.GP(Z)FL.wt   | 6001                                          | SEQ ID NO:1               | GP de ZEBOV tipo silvestre   |
| Ad26.Ebo.GP(S/G)FL.wt | 6610                                          | SEQ ID NO:3               | GP de SEBOV tipo silvestre   |
| Ad26.Mar.GP(A)FL      | 6712                                          | SEQ ID NO:4               | MARV Angola codón optimizado |

| Nombre del vector      | Número VRC del plásmido fuente para inserción | Secuencia de la inserción | Descripción                  |
|------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------|------------------------------|
| Ad35BSU.Ebo.GP(Z)FL.wt | 6001                                          | SEQ ID NO:1               | GP de ZEBOV tipo silvestre   |
| Ad35BSU.Ebo.GP(S/G)FL  | 6611                                          | SEQ ID NO:2               | GP de SEBOV tipo silvestre   |
| Ad35BSU.Mar.GP(A)FL    | 6712                                          | SEQ ID NO:4               | MARV Angola codón optimizado |

### COMPOSICIONES INMUNÓGENAS

- 5 Los vectores de adenovirus purificados o parcialmente purificados de la invención se pueden formular como una vacuna (también denominada “composición inmunogénica”) de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. Dichas composiciones pueden incluir adyuvantes para intensificar las respuestas inmunitarias. Las relaciones óptimas de cada componente en la formulación se pueden determinar mediante técnicas bien conocidas por los expertos en la materia.
- 10 La preparación y el uso de composiciones inmunogénicas son bien conocidos por los expertos en la materia. Las composiciones farmacéuticas líquidas generalmente incluyen un vehículo líquido tal como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Puede incluirse solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacáridos o glicoles como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol.
- 15 Las composiciones son adecuadas para administraciones únicas o para una serie de administraciones. Cuando se administran como una serie, las inoculaciones posteriores a la administración inicial (sensibilización) se administran para estimular la respuesta inmunitaria y se denominan generalmente inoculaciones de refuerzo. Las composiciones de la invención se pueden usar como una composición de refuerzo sensibilizada por antígeno utilizando cualquiera de una variedad de diferentes composiciones de sensibilización, o como la composición de sensibilización. Por lo tanto, un aspecto de la presente invención proporciona un método para sensibilizar y/o reforzar una respuesta inmunitaria a un antígeno en un individuo. Por ejemplo, en algunas realizaciones preferidas, una administración de sensibilización de un vector adenoviral de la invención (p.ej., rAd26) va seguida por una inoculación de refuerzo del segundo vector adenoviral (p.ej., rAd35).
- 20
- 25 El momento de la administración de las composiciones de refuerzo está dentro de la experiencia en la técnica. La composición de refuerzo generalmente se administra semanas o meses después de la administración de la composición de sensibilización, por ejemplo, aproximadamente 2-3 semanas o 4 semanas, u 8 semanas, o 16 semanas, o 20 semanas, o 24 semanas, o 28 semanas, o 32 semanas o uno o dos años.
- 30 Las composiciones de la invención pueden comprender otros antígenos de filovirus o las inoculaciones de sensibilización o refuerzo pueden comprender otros antígenos. Los otros antígenos usados en combinación con los vectores de adenovirus de la invención no son críticos para la invención y pueden ser, por ejemplo, antígenos de filovirus, ácidos nucleicos que los expresan, partículas similares a virus (VLP) o vectores virales de la técnica anterior. Tales vectores virales incluyen, por ejemplo, otros vectores adenovirales, vectores de virus vaccinia,
- 35 vectores avipox tales como de la viruela aviar o la viruela del canario, vectores del herpesvirus, vectores del virus de la estomatitis vesicular o vectores del alfavirus. Un experto reconocerá que las composiciones inmunogénicas de la invención pueden comprender múltiples antígenos y vectores.
- 40 Los antígenos en las respectivas composiciones de sensibilización y refuerzo (sin importar cuántas composiciones de refuerzo se empleen) no necesitan ser idénticos, sino que deben compartir determinantes antigénicos.
- Como se indicó anteriormente, las composiciones inmunogénicas de la invención pueden comprender adyuvantes. Los adyuvantes adecuados para la administración conjunta de acuerdo con la presente invención deben ser potencialmente seguros, bien tolerados y efectivos en personas, incluyendo QS-21, Detox-PC, MPL-SE, MoGM-CSF, TiterMax-G, CRL- 1005, GERBU, TERamide, PSC97B, Adjuvax, PG-026, GSK-I, GcMAF, B-a-lethine, MPC-026, Adjuvax, CpG ODN, Betafectin, Aluminio y MF59.
- 45
- 50 Otros adyuvantes que se pueden administrar incluyen lectinas, factores de crecimiento, citocinas y linfocinas tales como interferón alfa, interferón gamma, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor estimulante de las colonias de granulocitos (gCSF), factor estimulante de las colonias de granulocitos macrófagos (gMCSF), factor de necrosis tumoral (TNF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12 o los ácidos nucleicos que los codifican.

Como se indicó anteriormente, las composiciones de la invención pueden comprender un excipiente, vehículo, tampón, estabilizador u otros materiales farmacéuticamente aceptables, bien conocidos por los expertos en la materia. Tales materiales deben ser no tóxicos y no deben interferir con la eficacia del principio activo. La naturaleza precisa del vehículo u otro material puede depender de la vía de administración, por ejemplo, vías oral, intravenosa, cutánea o subcutánea, intramucosa (por ejemplo, intestino), intranasal, intramuscular o intraperitoneal. La administración es generalmente intramuscular.

La administración intramuscular de las composiciones inmunogénas se puede lograr usando una aguja para inyectar una suspensión del vector de adenovirus. Una alternativa es el uso de un dispositivo de inyección sin aguja para administrar la composición (usando, por ejemplo, Biojector™) o un polvo liofilizado que contiene la vacuna.

Para la inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, o la inyección en el sitio de afección, el vector de adenovirus estará en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable que está libre de pirógenos y tiene un pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos en la materia son capaces de preparar soluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como una inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de Ringer lactato. Se pueden incluir conservantes, estabilizadores, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos, según sea necesario. También se puede emplear una formulación de liberación lenta.

Generalmente, la administración tendrá un objetivo profiláctico para generar una respuesta inmunitaria contra un antígeno de filovirus antes de la infección o el desarrollo de síntomas. Las enfermedades y trastornos que pueden tratarse o prevenirse de acuerdo con la presente invención incluyen aquellos en los que una respuesta inmunitaria puede desempeñar un papel protector o terapéutico. En otras realizaciones, los vectores de adenovirus se pueden administrar como profilaxis posterior a la exposición.

Las composiciones inmunogénas que contienen los vectores de adenovirus se administran a un sujeto, dando lugar a una respuesta inmunitaria anti-filovirus en el sujeto. Una cantidad de una composición suficiente para inducir una respuesta inmunitaria detectable se define como una "dosis inmunológicamente eficaz". Como se muestra a continuación, las composiciones inmunogénas de la invención inducen una respuesta inmunitaria tanto humoral como celular. En una realización típica, la respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria protectora.

La cantidad real administrada y la tasa y el tiempo de administración dependerán de la naturaleza y gravedad de lo que se está tratando. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, las decisiones sobre la dosificación, etc., es responsabilidad de los médicos de cabecera y otros médicos, o en un contexto veterinario, de un veterinario, y generalmente tiene en cuenta el trastorno que se tratará, la afección del paciente individual, el sitio de administración, el método de administración y otros factores conocidos por los profesionales. Ejemplos de las técnicas y protocolos mencionados anteriormente se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A. ed., 1980.

Después de la producción de vectores de adenovirus y la formulación opcional de tales partículas en las composiciones, los vectores de adenovirus pueden administrarse a un individuo, particularmente a un humano o a otro primate. La administración puede ser a humanos u otro mamífero, por ejemplo, ratón, rata, hámster, cobaya, conejo, oveja, cabra, cerdo, caballo, vaca, burro, mono, perro o gato. La administración a un mamífero no humano no necesita ser con fines terapéuticos, pero puede ser para uso en un contexto experimental, por ejemplo, en la investigación de mecanismos de respuestas inmunitarias al vector de adenovirus.

En un ejemplo de régimen, se administra el vector de adenovirus (p.ej., intramuscularmente) en el intervalo de aproximadamente 100 µl a aproximadamente 10 ml de solución salina que contiene concentraciones de aproximadamente  $10^4$  a  $10^{12}$  partículas de virus/ml. Generalmente, el vector de adenovirus se administra en una cantidad de aproximadamente  $10^9$  a aproximadamente  $10^{12}$  partículas virales (pv) a un sujeto humano durante una administración, más generalmente desde aproximadamente  $10^{10}$  a aproximadamente  $10^{12}$  pv. Una vacunación inicial puede ser seguida por un refuerzo como se describió anteriormente. La composición puede, si se desea, presentarse en un kit, envase o dispensador, que puede contener una o más formas de dosificación unitarias que contienen el principio activo. El kit, por ejemplo, puede comprender una lámina metálica o de plástico, tal como un envase blíster. El kit, el envase o el dispensador pueden ir acompañados de instrucciones para la administración.

Las composiciones de la invención se pueden administrar solas o en combinación con otros tratamientos, ya sea de manera simultánea o secuencial dependiendo de la afección a tratar.

## Ejemplos

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no para limitar la invención reivindicada.

La optimización de los regímenes de inmunización debe tener en cuenta las distintas ventajas asociadas con la inmunización de una sola dosis o de sensibilización-refuerzo dependiendo de la necesidad de inmunidad inmediata frente a la inmunidad a largo plazo. Los brotes de EBOV y otros filovirus tienden a ocurrir repentinamente y se propagan rápidamente entre poblaciones en las que las instalaciones médicas son escasas. Por lo tanto, en estas

circunstancias, pueden ser deseables regímenes de vacuna a corto plazo. Por este motivo, se han desarrollado vacunas en monodosis con vectores rAd5 que contienen genes de la glucoproteína (GP) y de la nucleoproteína (NP) del EBOV en primates no humanos (Sullivan, *et al.*, 2006). Se ha demostrado que tales vacunas provocan respuestas inmunitarias fuertes en un mes (Sullivan, *et al.*, 2003), probablemente debido a los altos niveles de expresión de los insertos y el tropismo de Ad5 por las células dendríticas. Por otro lado, la inmunidad protectora a largo plazo probablemente requerirá un régimen de vacuna de sensibilización que comprende dos o más administraciones que pueden inducir una memoria de linfocitos T duradera. Por lo tanto, diseñamos una serie de experimentos para probar la inmunogenicidad y la potencia tanto para una sola inoculación como para una combinación de sensibilización- refuerzo utilizando vectores rAd35 y rAd26, y los resultados de estos estudios se presentan en este documento.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Generación de vacunas rAd contra el Ébola. Se construyeron vectores de vacuna rAd26 y rAd35 con delección E1/E3 y baja seroprevalencia que expresan las GP de EBOV, se cultivaron y se purificaron tal como se describió anteriormente (Abbink, *et al.*, 2007). Un vector Ad5, que no expresaba GP de EBOV se construyó, cultivó y purificó por el mismo método y se usó para inducir inmunidad a Ad5 en animales seleccionados como se indicó en cada experimento. Se clonaron insertos de GP de EBOV que abarcaban los marcos de lectura abiertos de las especies Zaire (SEQ ID NO:1) y Sudán/Gulu (SEQ ID NO:2) bajo control transcripcional del promotor CMV humano y la secuencia de poliadenilación de SV-40 en un plásmido que contiene la parte izquierda del genoma del Ad, incluida la ITR izquierda y la señal de empaquetado. La cotransfección de este plásmido con un cósmido que contiene la secuencia del Ad restante (con delección de E3) a células PER.C6® produjo un vector de vacuna Ad26 o Ad35 recombinante deficiente en replicación con delección de E1/E3. Para facilitar la replicación de los vectores rAd26 y rAd35 en células PER.C6®, las regiones E4 orf6 nativas fueron reemplazadas por la secuencia E4orf6 de Ad5 (Havenga, *et al.*, 2006). Los virus rAd se purificaron en placa y se expandió una placa de cada uno hasta una escala de producción de aproximadamente 2,4 l. Se usó un procedimiento de ultracentrifugación en gradiente de cloruro de cesio en dos etapas para purificar los vectores rAd EBOV. Las vacunas rAd contra el EBOV purificadas se almacenaron como alícuotas de uso único a una temperatura inferior a -65 °C. Los títulos de partículas de virus se determinaron midiendo la densidad óptica a 260 nm (Maizel, *et al.*, 1968 *Virology* 36(1):115-25). La infectividad se evaluó mediante TCID<sub>50</sub> usando células 911 (Fallaux, *et al.*, (1996) *Hum Gene Ther* 7(2):215-22). La expresión de GP de EBOV mediada por adenovirus se evaluó mediante infección de células A549 seguido de análisis de los lisados de cultivo mediante transferencia Western. La identidad de los vectores purificados se confirmó por PCR y las regiones transgénicas completas, que incluyen las secuencias flanqueantes se verificaron utilizando secuenciación de ADN.

Análisis filogenético. El árbol filogenético se construyó usando secuencias de aminoácidos del hexón de adenovirus de longitud completa. Las secuencias de aminoácidos se alinearon usando el programa Clustal X (Larkin, *et al.*, (2007) *Bioinformatics* 23(21):2947-8) y el árbol se construyó utilizando el método Clustal X Neighbor-Joining y el árbol fue sometido a remuestreo con reemplazo (bootstrap) 1000 veces. El árbol se visualizó y trazó usando el programa Drawtree del paquete Phylip Phylogeny Inference, versión 3.68.

Estudio de estimulación animal y seguridad. Los experimentos con animales se llevaron a cabo en total conformidad con todas las directrices federales relevantes y las políticas del NIH. Para todos los estudios se utilizaron macacos cinomolgos (*Macaca fascicularis*) de 3-5 años de edad y un peso de 2-3 kg adquiridos en Covance. Los monos fueron alojados individualmente y recibieron enriquecimiento regularmente según lo recomendado por la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (número DHEW NIH 86-23). Los animales fueron anestesiados con ketamina antes de la extracción de sangre o la vacunación. Cada grupo de vacuna en este estudio contenía tres macacos cinomolgos, y cada grupo control contenía un solo macaco cinomolgo. Cuatro semanas después de la vacunación contra el EBOV, los animales se transfirieron al Laboratorio de Contención Máxima (BSL-4) para la infección con una dosis objetivo de 1.000 UFP de EBOV Zaire administrada por vía intramuscular en el músculo caudal del muslo. El cultivo de reserva para estimulación con ZEBOV se preparó a partir de una persona fallecida en el brote de 1995 en el antiguo Zaire. Los animales permanecieron allí hasta la finalización del estudio. Mientras estaban en la instalación BSL-4, los monos fueron alimentados y controlados al menos una vez al día.

Los estudios en animales realizados en biocontención BSL-4 en USAMRIID fueron aprobados por el Comité de Uso y Cuidado Animal Institucional de USAMRIID. La investigación con animales se llevó a cabo de conformidad con la Ley de bienestar animal y otros estatutos y reglamentos federales relacionados con animales y experimentos con animales y se adhieren a los principios establecidos en la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio, Consejo Nacional de Investigación, 1996. Las instalaciones utilizadas están completamente acreditadas por la Asociación Internacional para la Evaluación y Acreditación del Cuidado de Animales de Laboratorio.

Inmunización animal. Los sujetos recibieron vacunas intramusculares en los deltoides bilaterales con una aguja y una jeringa con las dosis y los vectores indicados en cada experimento. Los animales seleccionados, como se indicó en cada experimento, se preinmunizaron con 10<sup>11</sup> UFP de un vector Ad5 vacío para inducir la inmunidad a Ad5. Los títulos de los anticuerpos anti-Ad5 mediante ELISA se establecieron en estos animales antes de la vacunación con EBOV.

IgG anti-GP de EBOV mediante ELISA. Las placas de ELISA de cloruro de polivinilo (Dynatech, Vienna, VA o Nunc, Rochester, NY) se recubrieron con 100 µl de antígeno por pocillo y se incubaron a 4 °C durante la noche. Las incubaciones posteriores se realizaron a temperatura ambiente. La GP de EBOV con delección transmembrana (EBOV GPΔTM) generada por transfección transitoria mediada por fosfato de calcio de células 293T sirvió como antígeno. Las placas se lavaron seis veces con PBS que contenía Tween 20 después del recubrimiento con antígeno. Los sueros de prueba se diluyeron en serie a 7 concentraciones que variaban de 1:50 a 1:50.000 y se añadieron a los pocillos recubiertos con antígeno durante 60 minutos. Las placas se lavaron seis veces seguido de incubación con anticuerpo de detección, anti-IgG humana de cabra (H+L, Chemicon/Millipore, Billerica, MA) conjugado con peroxidasa de rábano picante. Se añadió sustrato de dihidrocloruro de o-fenilendiamina (Sigma Fast, St. Louis, MO) a los pocillos y se determinó la densidad óptica (450 nm). Se analizó una muestra de suero de prevacunación para cada animal cada vez que se realizó el ensayo. Se analizó una muestra de suero de control positivo de un solo animal con una respuesta conocida de IgG a la GO del EBOV de Zaire cada vez que se realizó el ensayo. Los títulos de ELISA con sustracción de fondo se expresan como EC90, valores de densidad óptica recíprocos, que representan la dilución en la que se produce una disminución del 90 % en la unión al antígeno.

Tinción intracelular de citocinas. Muestras de sangre entera de macacos cinomolgos se sometieron a centrifugación en gradiente de densidad sobre Ficoll para aislar células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Aproximadamente  $1 \times 10^6$  células se estimularon en 100 µl de medio RPMI que contenía 10 % de suero fetal bovino inactivado por calor durante 6 horas a 37 °C con anticuerpos anti-CD28 (clon CD28.2) y CD49d (clon L25) (BD Biosciences), Brefeldin-A (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), y DMSO o un conjunto de péptidos que abarca todo el marco de lectura abierto de la GP de EBOV Zaire. Los péptidos contenían 15 restos superpuestos por 11 aminoácidos reconstituídos en DMSO estéril fresco a una concentración final de 2,5 µg/ml para cada péptido. Para cada equivalente de muestra, se estimuló una alícuota con SEB como control positivo. Después de la estimulación de seis horas, las PBMC se tiñeron con una mezcla de anticuerpos contra marcadores de linaje (CD3-Cy7-APC, clon SP34-2 (BD Biosciences), CD4-QD605 clon M-T477 (BD Biosciences), CD8-TRPE clon RPA-T8, CD95 Cy5-PE, clon DX2 (BD Biosciences), CD45RA QD655, clon 5H3, a temperatura ambiente durante 20 min. Los anticuerpos CD45RA QD655 y CD8-TRPE se conjugaron de acuerdo con protocolos estandarizados como se describió previamente (Koup *et al.*, 2010 Priming Immunization with DNA Augments Immunogenicity of Recombinant Adenoviral Vectors for Both HIV-1 Specific Antibody and T-Cell Responses. PLoS One 5(2): e9015. doi:10.1371/journal.pone.0009015). Después de 2 lavados, las células se fijaron y permeabilizaron con Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences) seguido de tinción con anticuerpos contra citocinas TNFα-APC, clon MAb11 (BD Biosciences) e IL-2 PE, clon MQ17H12 (BD Biosciences). Se incluyó el colorante de viabilidad ViViD (Invitrogen) para permitir la discriminación entre células vivas y muertas (Perfetto, *et al.*, (2006) J Immunol Methods 313(1-2): 199-208)- Las muestras se adquirieron en un citómetro LSR II (BD Biosciences), recogiendo hasta 1.000.000 de eventos y se analizaron usando el software FlowJo 9.1 y SPICE 5.0 (Tree Star). Las células positivas para citocinas se definieron como un porcentaje dentro de los subconjuntos de linfocitos T de memoria CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Los subconjuntos de memoria se definieron como CD45RA ±/CD95+ o CD28 ±/CD95+. En el último caso, CD28 Alexa488 (clon 28.2, BioLegend) se usó para la estimulación en lugar del mAb CD28 no conjugado.

Bioquímica sérica. Para los estudios de estimulación, se recogió sangre del NHP los días 0, 3, 6, 10, 14 y 28 después de la infección por EBOV Zaire. El recuento total de leucocitos, los leucocitos con fórmula diferencial, el recuento de eritrocitos, el recuento de plaquetas, los valores de hematocrito, la hemoglobina total, el volumen celular medio, el volumen corpuscular medio y la concentración de hemoglobina corpuscular media se determinaron a partir de muestras de sangre recogidas en tubos que contenían EDTA utilizando un analizador hematológico con láser (Coulter Electronics, Hialeah, FL, EE. UU.). Las muestras de suero se analizaron para determinar las concentraciones de aspartato aminotransferasa (AST), utilizando un analizador de sangre Piccolo Point-Of-Care (Abaxis, Sunnyvale, CA, EE. UU.).

Detección del EBOV. La titulación del virus se realizó por ensayo de placa en células Vero. Brevemente, se adsorbieron diluciones de 10 veces de muestras de plasma a monocapas de Vero en pocillos por duplicado (0,2 ml por pocillo), por lo que el límite de detección fue de 25 ufp/ml.

Estadística. La comparación de los títulos de IgG anti-GP mediante ELISA y la producción de citocinas intracelulares por subconjuntos de linfocitos T de memoria se realizó usando una prueba T de dos colas con el software GraphPad Prism.

## RESULTADOS

Filogenia del adenovirus y construcción de vectores. Las vacunas genéticas rAd5 para el EBOV proporcionan una potente inmunidad protectora en macacos, y se ha demostrado que son seguras e inmunogénas en ensayos clínicos en humanos (Asmuth, *et al.*; Kibuuka, *et al.*; Harro, *et al.*, 2009;). Los estudios en macacos y humanos han demostrado que la inmunidad dirigida por el vector preexistente puede limitar la potencia de las vacunas basadas en vectores virales (McCoy, *et al.*, 2007; Buchbinder, *et al.*, 2008). Dado que los datos de seroprevalencia sugieren que una gran proporción de personas en todo el mundo han experimentado una infección natural con Ad5, evaluamos otros serotipos de adenovirus para su uso como vectores de vacuna (Figura 1A). Ad35, un grupo B y Ad26, un grupo D de adenovirus segregan genéticamente de rAd5, Grupo C, por lo que planteamos la hipótesis de que los vectores

de vacuna derivados de estos serotipos serán menos sensibles a la inmunidad frente a Ad5 en primates. Aunque los vectores Ad35 y Ad26 usan receptores distintos del uso de Ad5, sin embargo demuestran una transducción eficiente de células dendríticas derivadas de monocitos y eluden la inmunidad frente a Ad5 en ratones. Por lo tanto, las inserciones de GP de las especies Zaire o Sudán/Gulu del EBOV se clonaron bajo control transcripcional del promotor de CMV humano en la región E1 de los vectores rAd35 y rAd26 (Figura 1B). Ambos genomas del vector han sufrido una delección de los genes E1 con el fin de hacerlos deficientes en la replicación y reducir el potencial de recombinación en sujetos vacunados.

Vacunación con rAd35 e inducción de respuestas inmunitarias en macacos. Los primeros estudios se realizaron con una vacuna contra una única especie del EBOV que codifica la GP del virus del Ébola de Zaire (ZEBOV), GP(Z), para probar la capacidad de los vectores rAd35 para inducir respuestas inmunitarias en macacos no expuestos a Ad5, y también para evaluar la potencia del vector dentro del contexto de inmunidad preexistente frente a Ad5. Seis macacos cinomolgos, tres no expuestos a Ad5 y tres inmunes a Ad5, se vacunaron cada uno por vía intramuscular con  $10^{10}$  partículas de rAd35-GP (Z) (Ad35BSU.Ebo.GP(Z)FL.wt) mediante inyección con aguja. Tres semanas después de la vacunación, se evaluaron las respuestas de anticuerpos y de linfocitos T específicos del antígeno en muestras de sangre periférica obtenidas de sujetos individuales. Los anticuerpos contra EBOV-GP(Z) evaluados mediante ELISA se indujeron en todos los sujetos, lo que demuestra que los vectores rAd35-GP(Z) mediaban la transducción *in vivo* con éxito de las células diana y la presentación eficiente del antígeno (Fig. 2A). Los sujetos expuestos a Ad5 e inmunes a Ad5 generaron títulos de anticuerpos en suero que variaban de aproximadamente 1:700 a 1:3000. Estos niveles de anticuerpos están en el intervalo que se ha observado para las vacunas a base de Ad5 que contienen insertos de GP(Z) y exceden el valor mínimo (1:500) que se ha asociado con la protección inmunitaria contra la infección por EBOV en este modelo de vacuna macaco-Ad (Sullivan, 2009). Aunque se indujeron títulos de anticuerpos significativos en todas las vacunas, ninguno de los sujetos excedió el título umbral (aproximadamente 1:3500) que predice una protección del 100 % después de la administración de vectores de vacuna Ad5-GP en macacos. Sin embargo, es digno de mención que la comparación de los títulos de anticuerpos en sujetos no expuestos a Ad5 frente a inmunes a Ad5 mostró que no hubo diferencias significativas en los títulos promedio obtenidos entre estos grupos (1:1600 frente a 1:1800 respectivamente), lo que sugiere que los vectores rAd35 son vacunas efectivas en sujetos que hayan estado expuestos previamente a Ad5.

Las respuestas inmunitarias celulares se evaluaron mediante tinción de citocinas intracelulares (ICS) para TNF- $\alpha$  (CD8<sup>+</sup>) o IL-2 (CD4<sup>+</sup>) después de la estimulación de PBMC objeto con péptidos solapantes que abarcan el marco de lectura abierto de la GP(Z) de EBOV. Se realizó una tinción superficial de linfocitos usando CD45RA y CD95 para evaluar respuestas inmunitarias específicas del antígeno en las subpoblaciones de linfocitos T de memoria CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> (Fig. 2B-C). Como se observó para las respuestas de anticuerpos, los macacos vacunados con el vector rAd35 generaron inmunidad celular contra EBOV-GP, y la frecuencia de linfocitos T específicos del antígeno no se vio afectada por el estado inmune frente a Ad5. La magnitud del orden jerárquico de las respuestas celulares en ambos linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en los sujetos fueron similares a las respuestas de anticuerpos, aunque la frecuencia de linfocitos T específicos del antígeno para un sujeto V3 estaba por debajo de los niveles detectables. Estudios previos en macacos han demostrado que los vectores de vacuna a base de rAd5 inducen frecuencias linfocitos T CD8<sup>+</sup> que son dominantes sobre las respuestas CD4<sup>+</sup>. En el presente estudio, los sujetos vacunados con rAd35 generaron linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> específicos del antígeno en frecuencias similares. Sin embargo, dado el número relativamente pequeño de sujetos probados, es posible que las diferencias, si están presentes, no puedan ser reveladas. En conjunto, estos resultados demuestran que rAd35-GP es inmunógeno en macacos cinomolgos y que la potencia del vector para la inducción de respuestas inmunitarias humores y celulares específicas no se reduce en sujetos con inmunidad preexistente a Ad5.

Exposición de los macacos vacunados con rAd35 a ZEBOV. A continuación, probamos si la vacunación con rAd35-GP proporciona protección contra la exposición infecciosa con una dosis alta de ZEBOV. Una semana después de la evaluación de la respuesta inmunitaria mostrada anteriormente, los seis macacos cinomolgos vacunados con rAd35-GP y no expuesto se expusieron a 1000 UFP de la cepa 1995 Kikwit de ZEBOV por inyección intramuscular. Las enzimas hepáticas se midieron regularmente después de la exposición infecciosa ya que las elevaciones en estos marcadores son características de la infección por EBOV productiva en macacos. Los niveles circulantes de aspartato transaminasa (AST) se evaluaron cada 3-4 días durante el período de infección aguda, hasta el día 10-14 (Figura 2D), y luego el último día del período de seguimiento de 28 días (no se muestra). La AST plasmática se mantuvo en los niveles basales hasta el día 3 después de la infección en todos los sujetos, lo que indica una función hepática normal inmediatamente después de la exposición infecciosa al EBOV. El día 6 después de la exposición al EBOV, el sujeto de control no vacunado mostró un aumento de 10 veces en los niveles enzimáticos, lo que indicaba una infección activa en este sujeto. Las muestras de sangre de dos sujetos del grupo no expuesto a Ad5-naïve/vacunado con rAd35 (V1, V3) también exhibieron incrementos drásticos de la AST, mientras que el tercer sujeto en este grupo V2 mostró solo un aumento marginal en un punto temporal único antes de la resolución a los niveles basales. De forma similar, dos de tres sujetos en el grupo inmune a Ad5/vacunado con rAd35 (V4, V5) mostraron elevaciones de la AST, aunque mucho menores que el control no vacunado, mientras que en un sujeto V6 este parámetro de infección permaneció dentro de valores normales. En general, los niveles de AST fueron más altos en los sujetos no expuestos a Ad5 que en los sujetos vacunados inmunes frente a Ad5. Es digno de mención que cada sujeto que permaneció normal para esta observación clínica mostró las mayores respuestas de CD8<sup>+</sup> y de

anticuerpos específicas del antígeno pre-exposición dentro de su grupo de vacuna respectivo. Los niveles de viremia en plasma (Figura 2E) confirmaron la infección por EBOV en todos los animales que presentaron AST elevada.

Los resultados de este experimento muestran que rAd35 es inmunógeno cuando se administra en una dosis de  $10^{10}$  partículas por sujeto. La vacuna generó respuestas inmunitarias protectoras, pero esta dosis y régimen no fueron óptimos para la protección uniforme de todos los sujetos. Dentro de los grupos de vacunas, la inmunidad protectora se asoció con la mayor magnitud de respuestas de anticuerpos y linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicas del antígeno.

Efectos de la respuesta a la dosis de rAd35-GP sobre la inducción de inmunidad protectora. Los vectores a base de rAd se administran comúnmente a los macacos en dosis que varían desde  $10^{10}$  a  $10^{12}$  partículas. Los resultados anteriores con rAd5-GP han demostrado  $10^{10}$  partículas de virus como la dosis mínima para lograr el 100 % de protección de los macacos cinomolgos contra la infección por EBOV (Sullivan, 2006). Dado que los estudios descritos anteriormente se realizaron en el extremo inferior de este intervalo de dosis y no dieron como resultado una protección uniforme, es posible que la expresión del antígeno *in vivo* lograda con el vector rAd35 que es incluso ligeramente más baja cuando se compara con la de los vectores rAd5 podría dar como resultado respuestas inmunitarias subóptimas. Por lo tanto, nos preguntamos si la administración de una dosis de vacuna más alta podría provocar un mayor grado de protección inmunitaria. La vacuna en este experimento también incluyó GP que se expresaba en rAd35 de la especie EBOV de Sudán (S/G) para comparar la eficacia con datos históricos con vacunas rAd5 que comprendían GP de especies tanto de Sudán como de Zaire. En el presente estudio, macacos cinomolgos ( $n = 3$  por grupo) fueron vacunados con  $10^{10}$  o  $10^{11}$  partículas de virus de Ad35BSU.Ebo.GP(Z)FL.wt y Ad35BSU.Ebo.GP(S/G)FL y las respuestas inmunitarias se midieron tres semanas después de la vacunación en el experimento previo.

Se generaron anticuerpos específicos de GP en todos los sujetos (Figura 3A), un resultado esperado ya que la dosis de vacuna fue igual o mayor que en el experimento previo. Sin embargo, los títulos en dos sujetos vacunados con  $10^{10}$  partículas en este experimento (V8, V9) fueron 1:340 y 1:500, respectivamente, niveles cercanos o inferiores al mínimo de corte previamente observado para predecir la protección en sujetos vacunados con Ad5-GP (Sullivan, *et al.*, 2009). El título de anticuerpos máximo observado fue de 1:2900 (sujeto V10), que es el mismo que los títulos máximos observados en los sujetos rAd35 mostrados en la Figura 2. Los títulos medios de anticuerpos fueron más altos en el grupo de dosis de  $10^{11}$  (1:1500 frente a 1:700) pero la diferencia no alcanzó la significación estadística ( $p = 0,02$ ). Como se observó en el grupo de dosis más baja, hubo un sujeto cuyo título estuvo cerca del límite de la vacuna rAd5-GP para la protección inmunitaria (sujeto V11, 1:540).

Las respuestas de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> estuvieron presentes en ambos grupos de dosis a las tres semanas después de la vacunación. No hubo una clara respuesta a la dosis en las respuestas de linfocitos T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>. Dado que la cinética de las respuestas inmunitarias celulares varía entre sujetos, especialmente en animales exogámicos, y la medición de la respuesta no es acumulada a lo largo del tiempo como ocurre con los niveles de anticuerpos, las tendencias grupales a veces son difíciles de capturar en un único punto temporal. Dentro de cada individuo, las frecuencias de linfocitos T específicos del antígeno fueron más altas para los linfocitos CD4<sup>+</sup> que para CD8<sup>+</sup>, pero cuando se combina con los resultados del primer experimento, no hubo tendencia hacia la dominancia de linfocitos CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> inducidos por los vectores rAd35-GP en estos experimentos.

Una semana después de la evaluación de las respuestas inmunitarias, los seis macacos vacunados y un sujeto no vacunado se expusieron a 1000 UFP de ZEBOV por inyección intramuscular y se observaron los signos de infección productiva. Las manifestaciones hemorrágicas de la infección por EBOV producen rutinariamente la aparición de una erupción maculopapular en la cara y las extremidades de los macacos infectados; los sujetos también suelen reducir la ingesta de alimentos y deshidratarse. La aparición más temprana de síntomas en los dos sujetos no vacunados ocurrió el día 6 después de la exposición al EBOV; el día 7 ambos mostraban una constelación completa de síntomas (datos no mostrados). La Tabla 2 muestra los resultados de la exposición infecciosa y el día de la muerte en los no supervivientes para ambos estudios rAd35. Los sujetos no vacunados sucumbieron a los efectos letales de la infección en los días 9 y 8 (Experimento 1 y 2, respectivamente). Los sujetos vacunados que murieron eran similares a los sujetos de control no vacunados, excepto que sobrevivieron un promedio de dos días más que los controles, lo que sugiere un posible beneficio inmunitario parcial de la vacunación, aunque finalmente se observó mortalidad. El número de supervivientes fue mayor en los sujetos que recibieron rAd35-GP(Z) solamente, en comparación con los que recibieron GP(Z) más GP(S/G) independientemente de la dosis de la vacuna, pero las diferencias en las tasas de supervivencia no fueron significativas en ningún grupo de vacunas en los dos experimentos de exposición.

Tabla 2

| Experimento | ID sujeto | Grupo de vacuna                                                        | Síntomas                                    | Resultado       |
|-------------|-----------|------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|-----------------|
| 1           | V1        | No expuesto/ Ad35BSU.Ebo.GP(Z)FL.wt con $10^{10}$                      | Erupción d6, anorexia d6, deshidratación d6 | Murió el día 7  |
|             | V2        | No expuesto/ Ad35BSU.Ebo.GP(Z)FL.wt con $10^{10}$                      | Anorexia d6                                 | Sobrevivió      |
|             | V3        | No expuesto/ Ad35BSU.Ebo.GP(Z)FL.wt con $10^{10}$                      | Erupción d6, anorexia d6, deshidratación d6 | Murió el día 8  |
|             | V4        | Inmune/Ad35BSU.Ebo.GP(Z)FL.wt con $10^{10}$                            | Erupción d7, anorexia d6, deshidratación d7 | Murió el día 8  |
|             | V5        | Inmune/Ad35BSU.Ebo.GP(Z)FL.wt con $10^{10}$                            | Erupción d6, anorexia d6, deshidratación d7 | Murió el día 9  |
|             | V6        | Inmune/Ad35BSU.Ebo.GP(Z)FL.wt con $10^{10}$                            | Anorexia d6                                 | Sobrevivió      |
| 2           | V7        | Ad35BSU.Ebo.GP(Z)FL.wt y Ad35BSU.Ebo.GP(S/G)FL, cada uno con $10^{10}$ | Erupción d6, anorexia d6, deshidratación d6 | Murió el día 6  |
|             | V8        | Ad35BSU.Ebo.GP(Z)FL.wt y Ad35BSU.Ebo.GP(S/G)FL, cada uno con $10^{10}$ | Erupción d6, anorexia d6, deshidratación d9 | Murió el día 10 |
|             | V9        | Ad35BSU.Ebo.GP(Z)FL.wt y Ad35BSU.Ebo.GP(S/G)FL, cada uno con $10^{10}$ | Erupción d6, anorexia d6, deshidratación d6 | Murió el día 6  |
|             | V10       | Ad35BSU.Ebo.GP(Z)FL.wt y Ad35BSU.Ebo.GP(S/G)FL, cada uno con $10^{11}$ | Erupción d6, anorexia d6, deshidratación d7 | Murió el día 7  |
|             | V11       | Ad35BSU.Ebo.GP(Z)FL.wt y Ad35BSU.Ebo.GP(S/G)FL, cada uno con $10^{11}$ | Erupción d6, anorexia d6, deshidratación d7 | Murió el día 7  |
|             | V12       | Ad35BSU.Ebo.GP(Z)FL.wt y Ad35BSU.Ebo.GP(S/G)FL, cada uno con $10^{11}$ | Erupción d6, anorexia d6, deshidratación d6 | Murió el día 8  |
| 1           | C1        | Ninguno                                                                | Erupción d6, anorexia d6,                   | Murió el día 9  |
| 2           | C2        | Ninguno                                                                | Erupción d7, anorexia d6, deshidratación d6 | Murió el día 8  |

En conjunto, los estudios que usaron rAd35 como vector de vacuna con GP(Z) solo o en combinación con GP(S/G) mostraron que la administración y presentación del antígeno era suficiente para generar respuestas inmunitarias específicas del antígeno, pero a niveles inferiores a los requeridos para la protección inmunitaria absoluta. La menor inmunidad protectora se asoció con los niveles de anticuerpos detectados en algunos animales de acuerdo con lo que se ha demostrado utilizando vectores rAd5 para que sean marginales para la protección.

Inmunogenicidad y potencia de la vacuna rAd26-GP para la protección contra la infección por EBOV. A continuación, evaluamos una vacuna a base de Ad26 recombinante, un adenovirus del grupo D, en cuanto a su capacidad de generar inmunidad protectora contra la infección por EBOV. Este serotipo usa el mismo receptor celular (CD46) que Ad35 pero se ha demostrado que genera respuestas inmunitarias ligeramente más altas cuando se usa como vector de vacuna de sensibilización (Liu, *et al.*, 2009). Para estos estudios, el aumento de la dosis se realizó en un intervalo de tres órdenes de magnitud en dos experimentos de exposición infecciosa por separado. En el primer estudio probamos la vacuna en dosis de  $10^{10}$  o  $10^{11}$  partículas para cada vector, Ad26.Ebo.GP(Z)FL.wt y Ad26.Ebo.GP(S/G)FL.wt, y en el segundo estudio usamos una dosis de  $10^{12}$  partículas para cada uno. El primer estudio probó la vacuna en macacos cinomolgos inmunes frente a Ad5 con el fin de evaluar si rAd26, como rAd35, podría provocar una respuesta inmunitaria específica del antígeno en presencia de inmunidad preexistente frente a Ad5. Se vacunaron cuatro macacos cinomolgos inmunes a Ad5 por grupo mediante inyección intramuscular, y se obtuvieron muestras de sangre tres semanas después para evaluar las respuestas inmunitarias humores y celulares circulantes contra la GP de EBOV (Figura 4A). Los títulos medios de anticuerpos anti-GP circulantes mostraron una respuesta a la dosis en los grupos de dosis; 1:700 para los vacunados con  $10^{10}$  partículas y 1:4500 para los sujetos que reciben  $10^{11}$  partículas ( $p = 0,06$ ). El título promedio para tres de cuatro sujetos en el grupo de dosis de  $10^{10}$  estaba justo por encima del umbral mínimo de protección inmunitaria en sujetos vacunados con rAd5 (1:500), pero el sujeto V16 generó solo una respuesta de anticuerpos marginal, 1:100, que estaba muy por debajo del límite de protección predicho para una vacuna Ad5-GP. Por el contrario, el sujeto V19 que fue vacunado con  $10^{11}$  partículas de la vacuna rAd26 generó un título de anticuerpos muy alto, 1:10.500, excediendo en casi el triple el nivel que se ha asociado con la protección inmunitaria completa (1:3500), mientras que el resto de este grupo de vacuna exhibieron títulos intermedios que no predicen definitivamente el resultado de la supervivencia. En el estudio dos, cuatro sujetos recibieron  $10^{12}$  partículas de cada vector rAd26 y generaron respuestas de anticuerpos muy similares a las de los grupo de dosis  $10^{11}$ , estando la mayoría de los títulos del sujeto entre 1:1000-1:4000. El título promedio de anticuerpos anti-GP para este grupo fue de 1:3000.

Las respuestas inmunitarias de los linfocitos T (Figura 4B, C) se midieron mediante ICS como en los estudios de rAd35 y también se observó una tendencia a una respuesta a la dosis en el estudio uno, pero la diferencia entre los grupos de dosis de  $10^{10}$  y  $10^{11}$  no fue significativa ( $p = 0,12$  y  $0,26$  para  $CD4^+$  y  $CD8^+$ , respectivamente). El promedio de las frecuencias de linfocitos T  $CD4^+$  específicos del antígeno fueron del 0,14 % para los vacunados que recibieron  $10^{10}$  partículas de rAd26-GP frente a 0,24 % con la dosis de vacuna más alta, y un vacunado en el grupo de dosis más baja, sujeto V14, tenía una respuesta  $CD4^+$  indetectable (Figura 4B). La vacuna rAd26 no distorsionó las respuestas inmunitarias celulares hacia la dominancia de  $CD4^+$  o  $CD8^+$ ; las frecuencias de  $CD8^+$ , 0,13 % y 0,25 % (dosis de vacuna de  $10^{10}$  y  $10^{11}$ , respectivamente) refleja esencialmente la magnitud de las respuestas  $CD4^+$ . En el caso de los linfocitos T  $CD8^+$ , hubo dos sujetos en el grupo de dosis baja, V13 y V14, con respuestas indetectables específicas del antígeno (Figura 4B, C). En el estudio de rAd26 dos, las frecuencias promedio de  $CD8^+$  específicos del antígeno (0,34 %) fueron más altas que las respuestas de  $CD4^+$  (0,08 %) pero este aparente sesgo hacia las respuestas  $CD8^+$  estaba principalmente determinado por un solo sujeto, V24, que tenía frecuencias de  $CD8^+$  muy altas y respuestas de  $CD4^+$  muy bajas. Por otro lado, las respuestas inmunitarias celulares generales fueron similares a las observadas en el estudio uno de rAd26.

Las exposiciones infecciosas al EBOV se realizaron mediante inyección IM de 1000 UFP de ZEBOV a las 4 semanas después de la vacunación para cada uno de los estudios de la vacuna rAd26, y se midieron los niveles de enzimas hepáticas para controlar la enfermedad (Figura 4D). Los sujetos no vacunados exhibieron manifestaciones de lesión hepática entre los días 3 y 6 de infección. Todos los sujetos que reciben la dosis más baja de vacuna rAd26,  $10^{10}$  partículas, mostraron signos similares enfermedad, aunque los niveles de AST aumentaron a un ritmo más lento. Como se predijo a partir de este indicador clínico, todos los sujetos en este grupo sucumbieron a los efectos letales de la infección en el día 8 después de la exposición a ZEBOV (Figura 5A). Las respuestas de anticuerpos y linfocitos T fueron bajas o indetectables en algunos sujetos de este grupo. Las diferencias en la magnitud de las respuestas inmunitarias entre los grupos de dosis en el estudio de Ad26 uno ( $10^{10}$  y  $10^{11}$ ) se reflejaron generalmente en las tasas de supervivencia, con un resultado de supervivencia más alto, 2 de 4 protegidos, en sujetos vacunados con  $10^{11}$  partículas de rAd26-GP ( $p = 0,01$ ). Ad26 con  $10^{11}$  partículas fue superior no solo a la dosis más baja, sino que también proporcionó una mayor protección que rAd35-GP cuando se combinaron para la dosificación (Figura 5B). Finalmente, rAd26 administrado en una dosis de  $10^{12}$  partículas produjo el mayor número de supervivientes (3 de 4) para cualquier régimen de vacuna probado en estos estudios, y el nivel de protección inmunitaria no difirió significativamente de lo que se había observado previamente con los vectores rAd5 ( $p = 0,32$ , Figura 5C); sin embargo, esta tasa de supervivencia se obtuvo usando una dosis más alta para rAd26 que para rAd5,  $10^{12}$  frente a  $10^{10}$  partículas, respectivamente, lo que sugiere una posible diferencia de potencia entre estos vectores en este modelo animal.

Vacunación heteróloga de sensibilización-refuerzo con vectores rAd26 y rAd35. Las características de dosis-respuesta para la protección inmunitaria mediada por rAd26-GP y el alto resultado de supervivencia usando  $10^{12}$  partículas de vector sugirieron que este vector induce de manera eficiente la expresión del antígeno GP. Dado que se ha demostrado para EBOV y otros patógenos, tanto en sujetos humanos como no humanos, que la vacunación heteróloga sensibilización-refuerzo puede provocar una inmunidad más potente que la inmunización de monodosis (Sullivan Nature 2000; Sampra *et al.*, Vaccine 27 (2009) 5837-5845; Koup, *et al.*, PLoS One 2010; Geisbert *et al.*, (2010) Virol 84(19):10386-94), preguntamos si las respuestas inmunitarias rAd26-GP podrían reforzarse con un

vector heterólogo para mejorar la protección contra la infección por EBOV. Cuatro macacos cinomolgos fueron inoculados con  $10^{11}$  partículas de Ad26.Ebo.GP(Z)FL.wt y Ad26.Ebo.GP(S/G)FL.wt. Un mes después, todos los sujetos recibieron una vacunación de refuerzo con la misma dosis de Ad35BSU.Ebo.GP(Z)FL.wt y Ad35BSU.Ebo.GP(S/G)FL. Las respuestas inmunitarias se evaluaron inmediatamente antes y tres semanas después del refuerzo. La Figura 6A muestra que las respuestas de anticuerpos contra EBOV-GP(Z) se indujeron de manera eficaz mediante la vacunación de sensibilización. Los sujetos individuales generaron títulos de anticuerpos EC90 contra GP de 1:2700 a 1:7100, y el título promedio para el grupo fue de 1:4000, en consonancia con las respuestas observadas en el estudio anterior donde se probaba  $10^{11}$  de rAd26 como vacuna de inoculación única (1:4500). Este estudio incluyó para la comparación un solo sujeto inoculado con  $10^{10}$  partículas de rAd5-GP(Z) y rAd5-GP(S/G), cuyo título de anticuerpos después de la vacunación fue de 1:6800. La inoculación posterior de los sujetos sensibilizados con rAd26-GP con  $10^{11}$  partículas de vectores rAd35-GP reforzó los niveles de anticuerpos específicos del antígeno aproximadamente un orden de magnitud para la mayoría de los vacunados, con un título promedio de 1:32.000, excepto el sujeto V27 cuyos títulos de anticuerpos post-sensibilización fueron excepcionalmente altos. Curiosamente, la vacunación de refuerzo generó títulos más uniformes en todos los sujetos, con una desviación estándar entre los sujetos de poco menos del 10 %, en comparación con los títulos post-sensibilización que exhibieron una desviación estándar del 54 %.

Las respuestas inmunitarias celulares también se reforzaron notablemente mediante la administración de rAd35-GP a macacos vacunados con rAd26 (Fig. 6B, C). Los linfocitos T  $CD4^+$  se reforzaron en todos excepto en un sujeto, V25; el aumento promedio después de la administración de rAd35-GP fue 2 veces mayor en todos los sujetos y el refuerzo reveló una respuesta mensurable en el sujeto V27 cuya respuesta no fue detectable antes del refuerzo. Por último, las frecuencias de linfocitos T  $CD4^+$  post-refuerzo fueron comparables a las generadas por la vacunación con rAd5-GP. El efecto de refuerzo fue mayor para los linfocitos T  $CD8^+$  y todos los sujetos exhibieron el efecto de refuerzo en este compartimiento celular produciendo, en dos sujetos (V27 y V28), respuestas que excedían las generadas por la vacunación con rAd5-GP. Las frecuencias de linfocitos T  $CD8^+$  específicas de GP promedio medias por ICS fueron 0,09 % después de la inmunización primaria, y aumentaron 4,7 veces hasta 0,41 %, 3 semanas después de la vacunación secundaria con rAd35-GP.

En conjunto, los resultados de inmunogenicidad anteriores mostraban que los vectores rAd35-GP son potentes para el refuerzo de macacos sensibilizados con rAd26-GP. Los anticuerpos dirigidos contra GP post-refuerzo se indujeron a un nivel promedio que es casi un logaritmo más alto que el nivel predictivo de 100 % de protección inmunitaria en primates vacunados con rAd5-GP (Sullivan, *et al.*, 2009). Es importante destacar que el refuerzo con rAd35-GP proporcionó una mejora sustancial de las frecuencias de linfocitos T  $CD8^+$ , las cuales también se asocian con la protección inmunitaria contra la infección por EBOV. Por lo tanto, una semana después de la evaluación de la respuesta inmunitaria (4 semanas después del refuerzo) todos los sujetos vacunados y un macaco de control no vacunado se expusieron a 1000 UFP de ZEBOV por inyección intramuscular. El sujeto de control presentó síntomas clínicos característicos de la infección por EBOV y sucumbió a los efectos letales el día 6 después de la exposición (Figura 6C, D). Por el contrario, todos los sujetos vacunados se mantuvieron normales para los niveles circulantes de AST (Figura 6C), y no exhibieron evidencia de enfermedad hemorrágica en la evaluación de la patología macroscópica al finalizar el estudio (no se muestra). Los cuatro sujetos vacunados sobrevivieron a la exposición infecciosa y permanecieron sin síntomas durante el período de seguimiento de 28 días hasta la finalización del estudio. Estos resultados mostraron que los vectores rAd26/rAd35 administrados como un régimen de vacuna heterólogo de sensibilización-refuerzo proporcionan una protección inmunitaria uniforme contra la infección por ZEBOV, y demuestran la utilidad potencial de este enfoque para lograr resultados aditivos o sinérgicos con vacunas combinadas.

## DISCUSIÓN

Los adenovirus funcionan bien como vectores de vacunas para la administración de una variedad de antígenos virales bacterianos y parasitarios (Lasaro *et al.*, (2009) Mol Ther 17(8):1333-9). Los vectores rAd5 en particular generan respuestas inmunitarias específicas de antígeno potentes en ratones, primates no humanos y humanos, como hemos observado cuando la GP del EBOV es el antígeno diana. Sin embargo, los estudios preclínicos y clínicos en humanos han sugerido que la potencia de los vectores a base de rAd5 puede verse comprometida en individuos que han estado expuestos previamente a Ad5 si tienen un alto nivel de inmunidad contra el vector. El objetivo de los estudios en la presente memoria fue identificar los vectores rAd que pueden administrar el antígeno GP del EBOV en sujetos tanto inmunes a como no infectados con Ad5. Como la inmunidad preexistente contra cualquier vector viral tiene el potencial de limitar su efectividad, centramos nuestra atención en los virus que infectan a los seres humanos con relativa poca frecuencia, como lo indica la prevalencia de sujetos seropositivos y/o los bajos niveles de anticuerpos neutralizantes. Los raros serotipos de adenovirus humanos, Ad35 y Ad26 fueron seleccionados para el desarrollo de vacunas en el trabajo actual.

La vacunación con rAd35-GP de macacos generó respuestas de anticuerpos y linfocitos T específicas del antígeno en sujetos individuales dentro del intervalo observado previamente cuando se utilizaba rAd5 como vector de administración. El título promedio de anticuerpos anti-GP para todos los vacunados con rAd35 (independientemente de la dosis), 1:1400 fue inferior al promedio de todos los sujetos históricos vacunados con  $10^{10}$  de rAd5-GP (1:11.000,  $n = 17$ ), proporcionando una indicación inicial de que la potencia del vector podría diferir entre los dos

serotipos si el título de anticuerpos es el mismo correlacionado para rAd35 que para las vacunas rAd5 EBOV. Las respuestas de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> fueron detectables en la mayoría de los sujetos antes de la exposición infecciosa, aunque la magnitud absoluta no se puede comparar con las vacunas rAd5 no incluidas en estos estudios en ausencia de muestras de PBMC para los controles de puente del ensayo.

La vacunación con vectores rAd35 indujo eficazmente respuestas inmunitarias de anticuerpos y linfocitos T específicas del antígeno en sujetos no expuestos a rAd5 o inmunes a rAd5, lo que sugiere que los genomas de vectores de serotipos raros están suficientemente distantes de los serotipos comunes para resistir la inmunidad heteróloga dirigida por vectores. Esta característica del rendimiento del vector será importante para eludir la inmunidad preexistente que se deriva no solo de la infección viral natural, sino también del uso de vectores heterólogos en las inmunizaciones o vacunación de sensibilización contra otros patógenos. De hecho, la inoculación con rAd35-GP proporcionó un potente refuerzo tanto de las respuestas celulares como de las de los anticuerpos en los macacos sensibilizados con rAd26-GP. Este resultado fue intrigante ya que demuestra una clara diferencia en la potencia del vector para la inducción de respuestas inmunitarias secundarias frente a las primarias; la capacidad de rAd35-GP para aumentar la respuesta inmunitaria no fue predicha por la magnitud de las respuestas observadas después de la inmunización de sensibilización. Estos datos pueden indicar que rAd35 y otros vectores rAd tienen una mayor eficacia de transducción en ciertas poblaciones o estados de activación de las células dendríticas diana, como lo sugirió recientemente Lindsay *et al.*, J Immunol 185(3):1513-21, que pueden, en este caso, ser más abundantes o accesibles durante las respuestas inmunitarias secundarias.

rAd26 demostró ser más potente que rAd35 como una vacuna monodosis contra la infección por EBOV, mediando una supervivencia de hasta el 75 % de los macacos vacunados en la dosis más alta probada. Las vacunas rAd26-GP demostraron una clara respuesta a la dosis para la inducción de inmunidad protectora, sugiriendo que las mejoras marginales en la expresión del antígeno podrían aumentar la potencia de las vacunas a base de rAd26 para generar una protección uniforme contra altas dosis de exposición a EBOV como las utilizadas en la presente memoria. Curiosamente, el mayor grado de protección ofrecido por los vectores rAd26-GP en comparación con rAd35-GP en una dosis coincidente ( $10^{11}$  partículas) estaba asociado con títulos ELISA anti-GP mayores, 1:4500 frente a 1:1400, respectivamente. Estos datos ponen de relieve la posibilidad de que los títulos de anticuerpos previos a la exposición puedan servir como una correlación de la inmunidad de la protección contra la infección por ZEBOV en los serotipos rAd además de dentro de los grupos de vectores como se ha observado para las vacunas rAd5-GP. El orden de potencia para la inducción de respuestas de anticuerpos predijo el orden de rango para la protección entre los grupos de vectores.

Los estudios de la presente memoria probaron vectores de vacunas que se compararon solos y en combinación y demuestran la utilidad de rAd de serotipos alternativos para su uso como vectores de vacuna en primates. Los resultados sugieren que estas vacunas pueden ser más útiles en una combinación de sensibilización-refuerzo.

Debido a la gran magnitud de las respuestas específicas del antígeno logradas por la vacunación heteróloga sensibilización-refuerzo, se ha propuesto que la inmunidad a largo plazo se puede lograr de manera óptima cebando rAd con ADN (Santra, *et al.*, (2005). J Virol 79 (10):6516-22). Dado que el ADN requiere múltiples cebados y no induce una protección rápida como lo hacen los vectores rAd, la vacunación heteróloga sensibilización-refuerzo con rAd puede proporcionar una oportunidad óptima para generar un equilibrio entre la inducción de una inmunidad protectora rápida y otra de larga duración.

LISTADO INFORMAL DE SECUENCIAS

SEQ ID NO:1

GP del EBOV Zaire tipo silvestre

cgtcgtcgacacgtgtgatcagatcgcggccgctctagaccaggccctggatcgatccaacaacacaatgggcgttacaggaatttgc  
agttacctcgtgatcgattcaagaggacatcattcttcttgggtaattatccttttccaaagaacattttccatcccacttggagtcacccaat  
agcacattacaggttagtgatgtcgacaaactagttgtcgtgacaaactgtcatccacaaatcaattgagatcagttggactgaatctcgaa  
ggaatggagtggaactgacgtgccaatcgcaactaaaagatggggcttcagggtccggtgtccaccaaaagtggtcaattatgaagctgg  
tgaatgggctgaaaactgctacaatcttgaatcaaaaaactgacgggagtgatgtctaccagcagcggcagacgggattcggggcttc  
ccccgggtgccgtatgtgcacaaagtatcagggaacgggacccgtgtgccggagactttgcttccataaaaggggtgcttcttctgtatgat  
cgacttgcctccacagttatctaccagggaacgactttcgtgaagggtgtcgttgcattctgatactgccccaaagtaagaaggacttctcag  
ctcacacccttgagagagccggtcaatgcaacggaggacccgtctagtggctactattctaccacaattagatatacaggctaccgggttttg  
aaccaatgagacagagtacttgttcagggttgacaatttgactacgtccaacttgaatcaagattcacaccacagtttctgctccagctgaat  
gagacaatatacaagtgggaaaaggagcaataccacgggaaaactaatttgaagggtcaacccgaattgatacaacaatcggggag  
tgggcttctgggaaaactaaaaaacctcactagaaaaattcgagtgaaagattgtctttcacagttgatcaacggagccaaaaacatc  
agtggtcagagtcggcgcaacttctccgaccagggaacacacaactgaagaccacaaaatcatggcttcagaaaaatcctctg  
caatggttcaagtgcacagtcgaaggaaggaggtgcagtgctgcatacaaaccttgcacaatctccacagtgctcccaatccctc  
aaccaaaccaggtccggacaacagcacccataataccctgtgataaacttgacatctctgaggcaactcaagttgaacaacatcaccgc  
agaacagacaacgacagcacgctccgacactccctgtccacgaccgcagccggacccccaaaagcagagaacaccaacacgagc  
aaggcactgacttctggaccccgccaccacaacaagtccccaaaaccacagcgagaccgtggcaacaacaacactatcaccaaga  
taccggagaagagagtgccagcagcgggaagctaggcttaattaccaatactattgtggagtcgacaggactgtacagggcgggagaa  
gaactcgaaagagaagcaattgtcaatgtcaacccaatgaacccaatattacattactggactactcaggatgaagtgctgcaatcgga  
ctggcctggataccatatttggggccagcagcgggaaggttaattacatagaggggctaattgcacaatcaagatggttaactgtgggtgag  
acagctggccaacgagacgactcaagctctcaactgttctgagagccacaactgagctacgcaccttttcaatcctcaaccgtaaggcaa  
ttgatttctgtgcagcgatggggcgccacatgccacattctgggaccggactgctgtatcgaaccacatgattggaccaagaacataaca  
gacaaaattgatcagattattcatgattttgttgataaaaccttccggaccagggggacaatgacaattgtgggacaggatggagacaatgg  
ataccggcaggtattggagttacaggcggttgaattgcagttatcgccttattctgtatgcaaaattgtcttttagttttctcagattgcttcatgg  
aaaagctcagcctcaaatcaatgaaccaggatttaattatggaattactgaaatcgaagattactgacaaatgataataatacactggagc  
tttaacatagccaatgtgattctaactccttaaaactcacagtttaatacaaaagggttgagggtaccgagctgaattga

SEQ ID NO:2

GP del EBOV Sudán/Gulu con codón optimizado

atggaggggcctgagcctgctgcagctgccagggacaagttcaggaagagcagcttctctgtgtgggtgatcatcctgttccagaaggcct  
tcagatgccccctggcggtgtgacaaacagcaccctggaggtgaccgagatcgaccagctggtgtgcaaggaccacctggccagcac  
cgaccagctgaagagcgtgggcctgaacctggaggggcagcggcgtgagcaccgacatccccagcggccaccaagaggtgggggttcag  
gagcggcgtgcttcccaaggtgtgagctacgagggccggcaggtgggcccagaaactgctacaacctggagatcaagaagcccagcgg  
cagcgagtgcttgcctcctcctcctgacggcgtgaggggcttccccaggtgcaggtacgtgcacaaggcccagggcaccggccctgcc  
ccggcgactacgcttccacaaggacggcgcccttctctgtacgacaggtggccagcaccgtgatctacagggcggtgaacttcgccg  
aggcgctgatcgcttctgatccttgccaagcccaaggagaccttctgacagccctccatcaggagccgtgaactacaccgag  
aacaccagcagctactacgccaccagctatclagatgacgagatcgagaacttcggcgccagcagcagcaccctgttcaagatcgac  
aacaacaccttctgtaggctgacagggcccccacacctcagttctgttccagctgaacgacaccatccacctgcaccagcagctgagc  
aacaccaccggcaggtgatctggaccttgacgccaacatcaacgccgacatcgccgagtggtggccttctgggagaacaagaagaacc  
tgagcgagcagctgagggggcagagagctgagcttcgagggcctgagcctgaacgagaccgagcagcagcggccagcagcagc  
atcaccaagggcgagatcagcgacagggccaccaggaagtacagcgacctgggtgcccaagaacagccccggcatgtgccccctgcac

atccccaggggcgagaccacctgcccagccagaacagcaccgaggggcaggggtggcggtgaacaccaggagaccatcaccca  
gaccggccaccatcatcggaaccaacggcaaccacatcgagatcagcaccatcggcacagggccagcagcagatccccagc  
agcagccccaccacggccctagccccaggggccagacccccaccaccacaccagcggaccagcgtgatggccaccgaggagcc  
caccacccctccggcagcagccccggaccaccaccaggggccctaccctgaccacccctgagaacatcaccaccggcgtgaagacc  
gtgctgccccaggagagcaccagcaacggcctgatcaccagcaccgtgaccggcatcctgggcagcctgggctgaggaaggagc  
aggaggcagaccaacaaggccaccggcaagtgaacccccacctgactactggaccggccaggagcagcacaacggccgg  
catcgctggattccctacttcggccccggcgccgagggcactacaccgaggcctgatgcacaaccagaacgcctggtgtgcccct  
gaggcagctggccaacgagaccaccaggccctgcagctgttctgaggggccaccaccgagctgaggacctacacctctgaacagg  
aaggccatcacttctgctgaggaggtggggcgccactgcaggttctggggcccgactgctgcatcgagccccacgactggacaa  
gaacatcaccgacaagatcaaccagatcatccagacttcacgacaacctctgccaaccaggacaacgacgacaactggtggaccg  
gctggcgcgagtgatacctgccggcatcgccatcaccggcatcatcgcctcgtgtgtgcaagctgctgtgtga

SEQ ID NO: 3

GP del EBOV Sudán/Gulu tipo silvestre

atgggggggtcttagcctactccaattgccagggacaaaatttcggaaaagctctttctttgttt  
gggtcatcatctttattccaaaaggccttttccatgcctttgggtgtgtgtgactaacagcacttt  
agaagtaacagagattgaccagctagtctgcaaggatcatcttgcatctactgaccagctgaaa  
tcagttgggtctcaacctcgaggggagcggagtatctactgatatcccatctgcaacaaagcgtt  
ggggcttcagatctgggtgttccctcccaagggtggtcagctatgaagcgggagaatgggctgaaaa  
ttgctacaatcttgaaataaagaagccggagcgggagcgaatgcttacccccaccgcccagatggg  
gtcagaggctttccaagggtgccgctatgttcacaaaagcccaagggaaccggggccctgccaggtg  
actacgcctttcacaaggatggagctttcttccctctatgacaggctggcttcaactgtaattta  
cagaggagtcaattttgctgagggggtaattgcattcttgatattggctaaaccaaagaaacg  
ttccttcagtcacccccattcgagaggcagtaaaactaactgaaaatacatcaagttattatg  
cccatcctacttggagtatgaaatcgaaaattttggtgctcaacactccacgaccttttcaa  
aattgacaataatacttttgttcgtctggacaggcccccacacgcctcagttccttttccagctg  
aatgataccattcaccttcaccaacagttgagtaatacaactgggagactaattttggacactag  
atgctaatatcaatgctgatattgggtgaatgggctttttgggaaaataaaaaaatctctccga  
acaactacgtggagaagagctgtctttcgaaagcttttatcgctcaacgagacagaagacgatgat  
gcggcatcgctcgagaattacaaagggaagaatctccgaccggggccaccaggaagtattcggaac  
tggttccaaagaattccccctgggatgggtccattgcacataaccagaaggggaaacaacattgcc  
gtctcagaattcgacagaagggtcgaagagtaggtgtgaacactcaggagaccattacagagaca  
gctgcaacaattataggaactaacggcaaccatattgcagatctccaccatcgggataagaccga  
gctccagccaaatccccgagttcctcaccgaccacggcaccaagccctgaggctcagacccccac  
aaccacacatcaggtccatcagtgatggccaccgaggaaccaacaacaccaccgggaagctcc  
ccgggccaacaacagaagcaccactctcaccaccccagaaaatataacaacagcgggttaaaa  
ctgtcctgccacaggagtccacaagcaacggtctaataacttcaacagtaacagggtattcttgg  
gagtccttgggcttcgaaaacgcagcagaagacaaaactaacaccaaagccacgggttaagtgaat  
cccaacttacactactggactgcacaagaacaacataatgctgctgggattgcctggatcccg  
actttggaccgggtgcggaaggcatatacactgaaggcctgatgcataacaaaaatgccttagt  
ctgtggaacttaggcaacttgcaaatgaaacaactcaagctctgcagctttttcttaagagccaca  
acggagctgcggacatataccatactcaataggaaggccatagatttcttctgcgacgatggg  
gcgggacatgcaggatcctgggaccagattgttgcattgagccacatgattggacaaaaaacat  
cactgataaaatcaaccaaatecatccatgatttcacgacaaccccttacctaatacaggataat  
gatgataattgggtggacgggctgggagacagtgatccctgcaggaataggcattactggaatta  
ttattgcaattattgctcttcttcttgcgtttgcaagctgctttgc

SEQ ID NO: 4

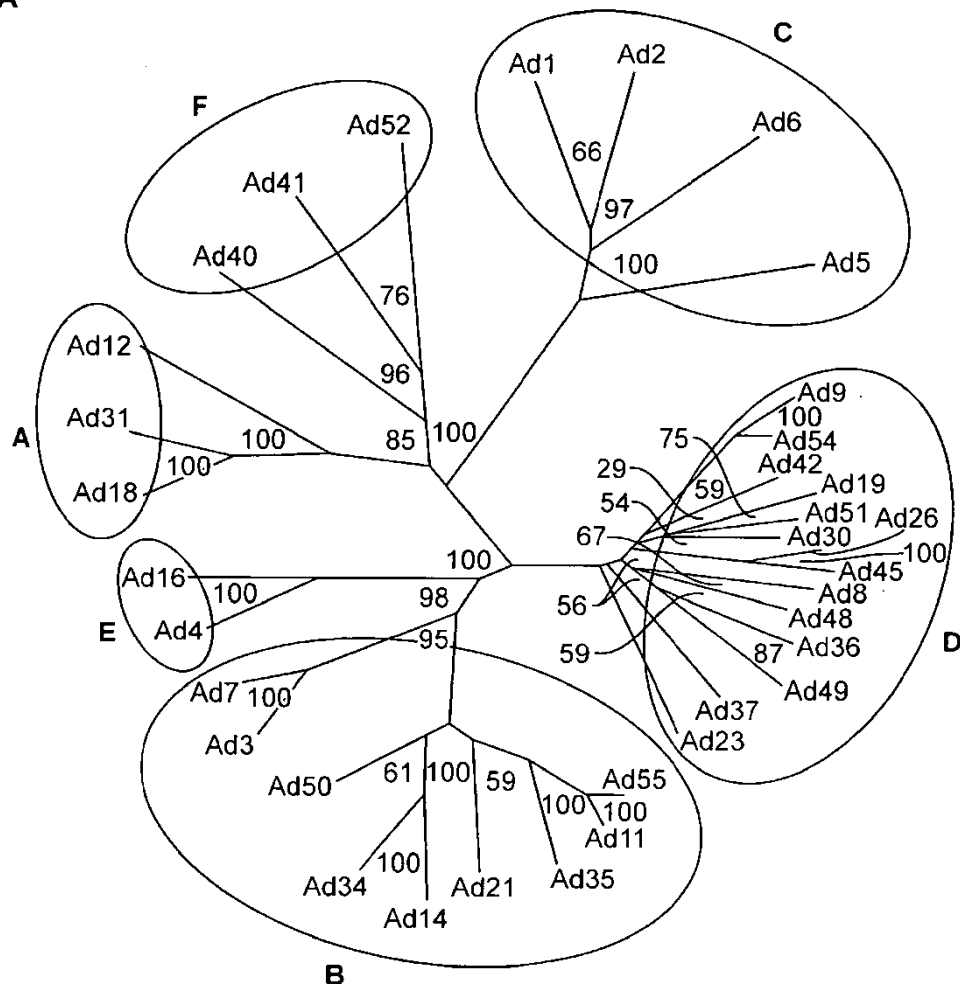
Virus de Marburgo Angola con codón optimizado

atgaagaccacctgcctgctgatcagcctgatcctgatccagggcgtgaagaccctgcccattcc  
tggagatcgccagcaacatccagccccagaacgtggacagcgtgtgcagcggcaccctgcagaa  
gaccgaggacgtgcacctgatgggcttcaccctgagcggccagaagggtggccgacagccctctg  
gaggccagcaagaggtgggcttcaggcgccggtgccccccaagaacgtggagtagaccgagg  
gcgaggaggccaagacctgctacaacatcagcgtgacccagccccagcggcaagagcctgctgct  
ggaccctcccaccaacatcagggaactaccctaagtgaagaccatccaccacatccaggggccag  
aaccctcacgcccagggcacgcctgcacctgtggggcgcccttcttctctgtacgacaggatcg  
ccagcaccaccatgtacagaggaaaagtgttcacagagggaacatcgctgctatgatcgtgaa  
caagaccgtgcataagatgatcttcagcagacagggacagggatatagacatatgaacctgaca  
tccacaaacaagtagctggacaagcagcaacgggaacacagacaaaacgatacaggatgttttggaa  
cactgcagggaatacaactccaccaagaaccagacatgtgcccctagcaagaagcctctgcctct  
gcctacagctcatcctgaagtgaagctgacatccacaagcacagatgccacaaagctgaacaca  
acagatcctaatacgacgacgagatctgacaacaagcggatccggatccggagaacagggaac  
cttatacaacaagcgacgctgctacaaaacagggaactgtcctccacaatgcctctacacctag  
ccctcagcctagcacacctcagcagggagggaacacacaaaaccattcccaggaggatggtgaca  
gaacctggaaagacaaacacacagcccagcctagcatgcctcctcataacacacaaacaatca  
gcacaaacaacacctccaagcacatctgagcacacctagcgtgcctattcagaaatgccaccaa  
ctacaacacacagtcacagccccctgaaaacgaacagacctccgcccccttccaaaacaacctg  
ctgcctacagaaaaccctacaacagccaagagcacaaacagcacaaagagccctacaacaacag  
tgcctaacacacaaacaagtatagcacaagccctagccctacacctaatccacagctcagca  
tctggtgtattttagaagaaagagaacatcctgtggagagaaggagatatgttccctttctg  
gatggactgatcaacgctcctatcgattttgatcctgtgcctaacacaaaagacaatctttgatg  
aaagcagcagcagcggagcctccgcccgaagaagatcagcatgcctcccctaacatcagcctgac  
actgagctattttccctaagggtgaacgaaaacacagcccattccggagaaaacgaaaacgattgt  
gatgccgaactgagaatctggagcgtgcaggaagatgatctggccgcccggactgagctggatcc  
cttttttgggcccgaattgaaggactgtacaccgcccggcctgatcaagaaccagaacaacct  
ggtgtgcaggctgaggaggtggccaaccagaccgccaagagcctggagctgctgctgagggtg  
accaccgaggagaggaccttcagcctgatcaacaggcacgccatcgacttctgctggctaggt  
ggggcggcacctgcaaggtgctgggccccgactgctgcacggcatcgaggacctgagcaggaa  
catcagcgagcagatcgaccagatcaagaaggacgagcagaaggaggcaccggctggggcctg  
ggcggcaagtgggtggaccagcactggggagtgctgacaaacctgggaatcctgctgctgctga  
gcattggcgtgctcattgctctgtcctgtatctgtagaatctttaccaagtacatcgga

# REIVINDICACIONES

1. Un primer y segundo vector de adenovirus recombinante que comprende cada uno un ácido nucleico que codifica una proteína antigénica de filovirus, en el que el primer vector de adenovirus comprende una proteína de la cápside del adenovirus 26 y en el que el segundo vector de adenovirus comprende una proteína de la cápside del adenovirus 35, para su uso en la inducción de una respuesta inmunitaria en un sujeto contra dicho antígeno de filovirus, administrando al sujeto, como una vacunación de sensibilización, una cantidad inmunológicamente eficaz de dicho primer vector de adenovirus recombinante; seguido de la administración a dicho sujeto, como una vacuna de refuerzo, de una cantidad inmunológicamente eficaz de dicho segundo vector de adenovirus, en el que las proteínas antigénicas de filovirus codificadas por el primer y segundo vectores de adenovirus recombinantes comparten al menos un determinante antigénico.
2. Los vectores de adenovirus recombinantes para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en los que los vectores de adenovirus se administran por vía intramuscular.
3. Los vectores de adenovirus recombinantes para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en los que la proteína antigénica de filovirus es una glucoproteína.
4. Los vectores de adenovirus recombinantes para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en los que la proteína antigénica de filovirus es de un virus del Ébola.
5. Los vectores de adenovirus recombinantes para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en los que el virus del Ébola es de la especie Zaire.
6. Los vectores de adenovirus recombinantes para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en los que la proteína antigénica de filovirus está codificada por una secuencia de polinucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1.
7. Los vectores de adenovirus recombinantes para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en los que el virus del Ébola es de la especie Sudán/Gulu.
8. Los vectores de adenovirus recombinantes para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en los que la proteína antigénica de filovirus está codificada por una secuencia de polinucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 2.
9. Los vectores de adenovirus recombinantes para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en los que la proteína antigénica de filovirus está codificada por una secuencia de polinucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 3.
10. Los vectores de adenovirus recombinantes para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en los que la proteína antigénica de filovirus es del virus de Marburgo.
11. Los vectores de adenovirus recombinantes para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en los que la proteína antigénica de filovirus está codificada por una secuencia de polinucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 4.

**A**



B

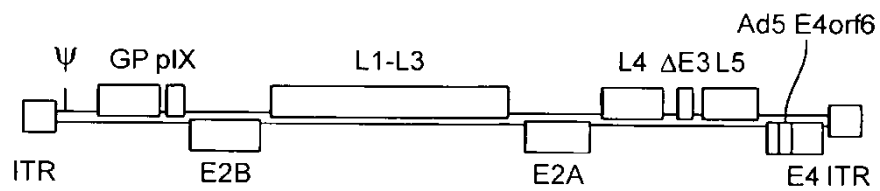


FIG. 1

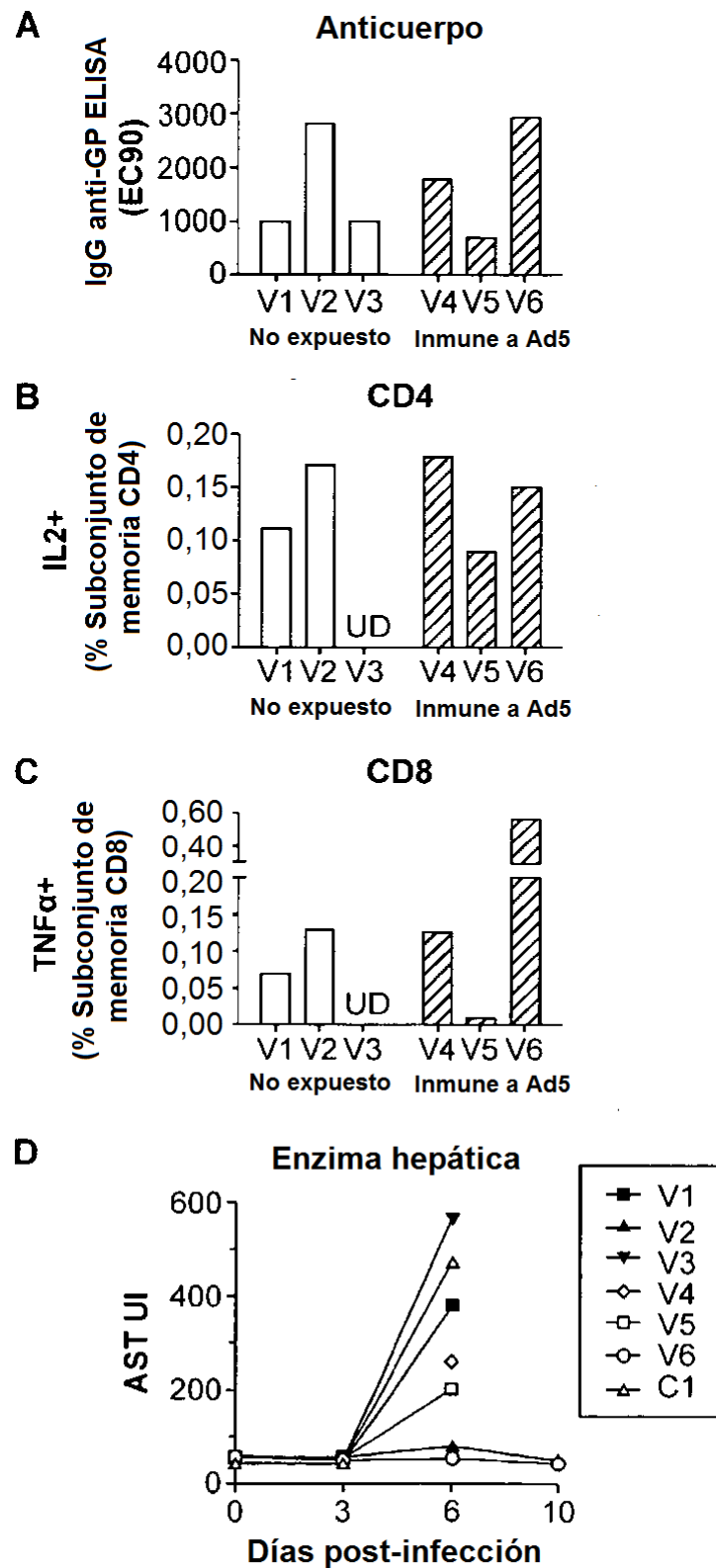


FIG. 2

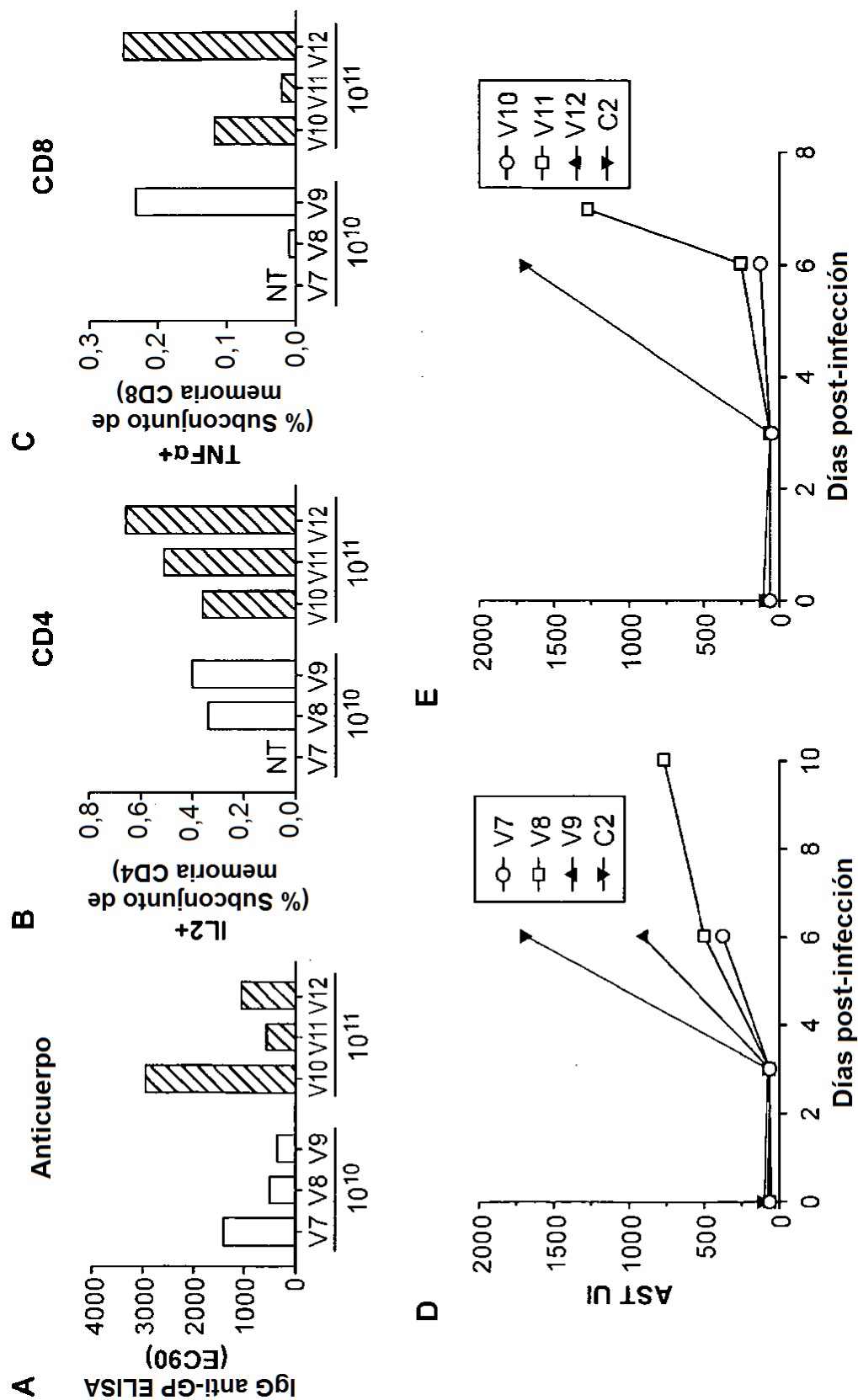


FIG. 3

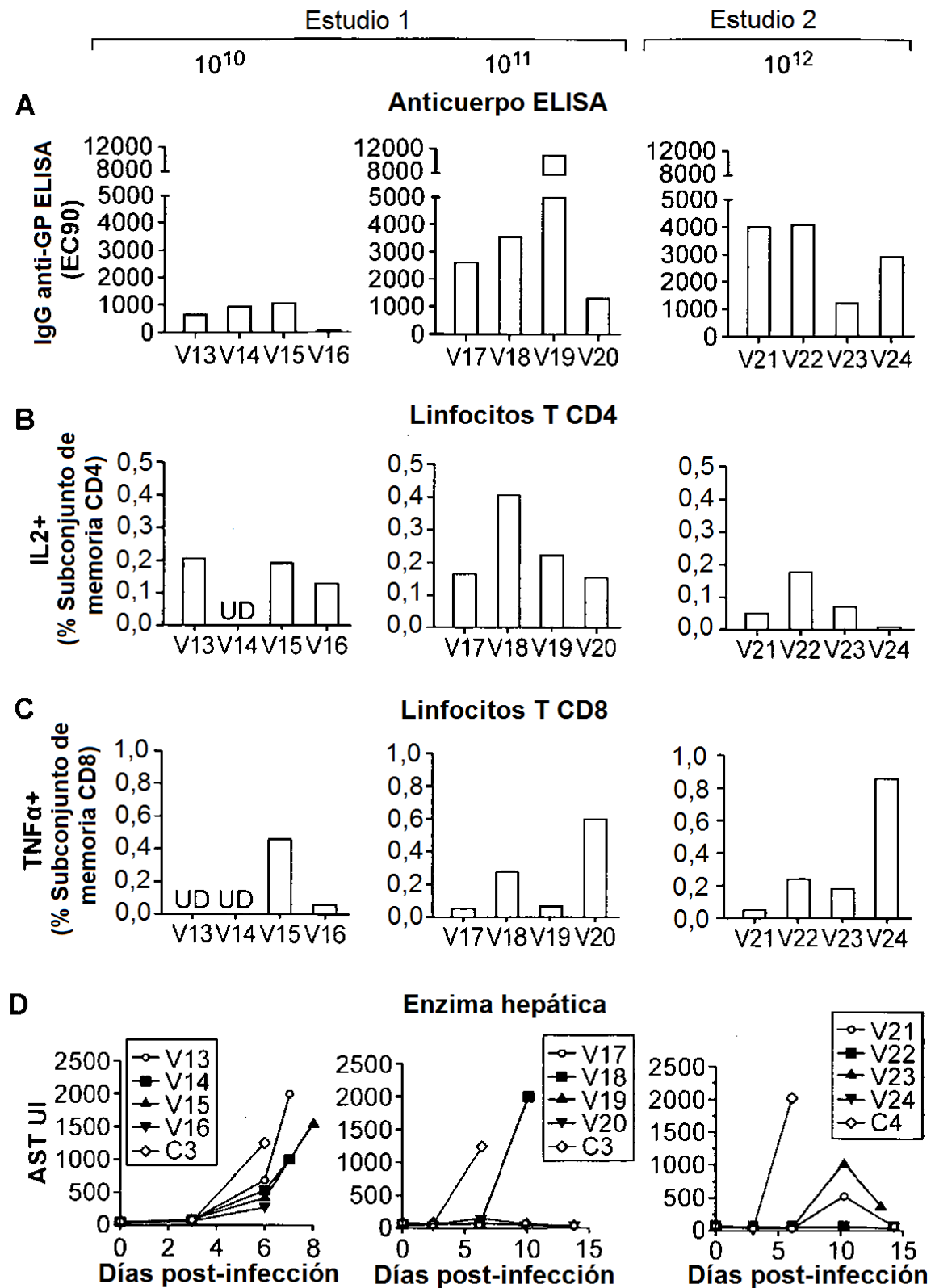


FIG. 4

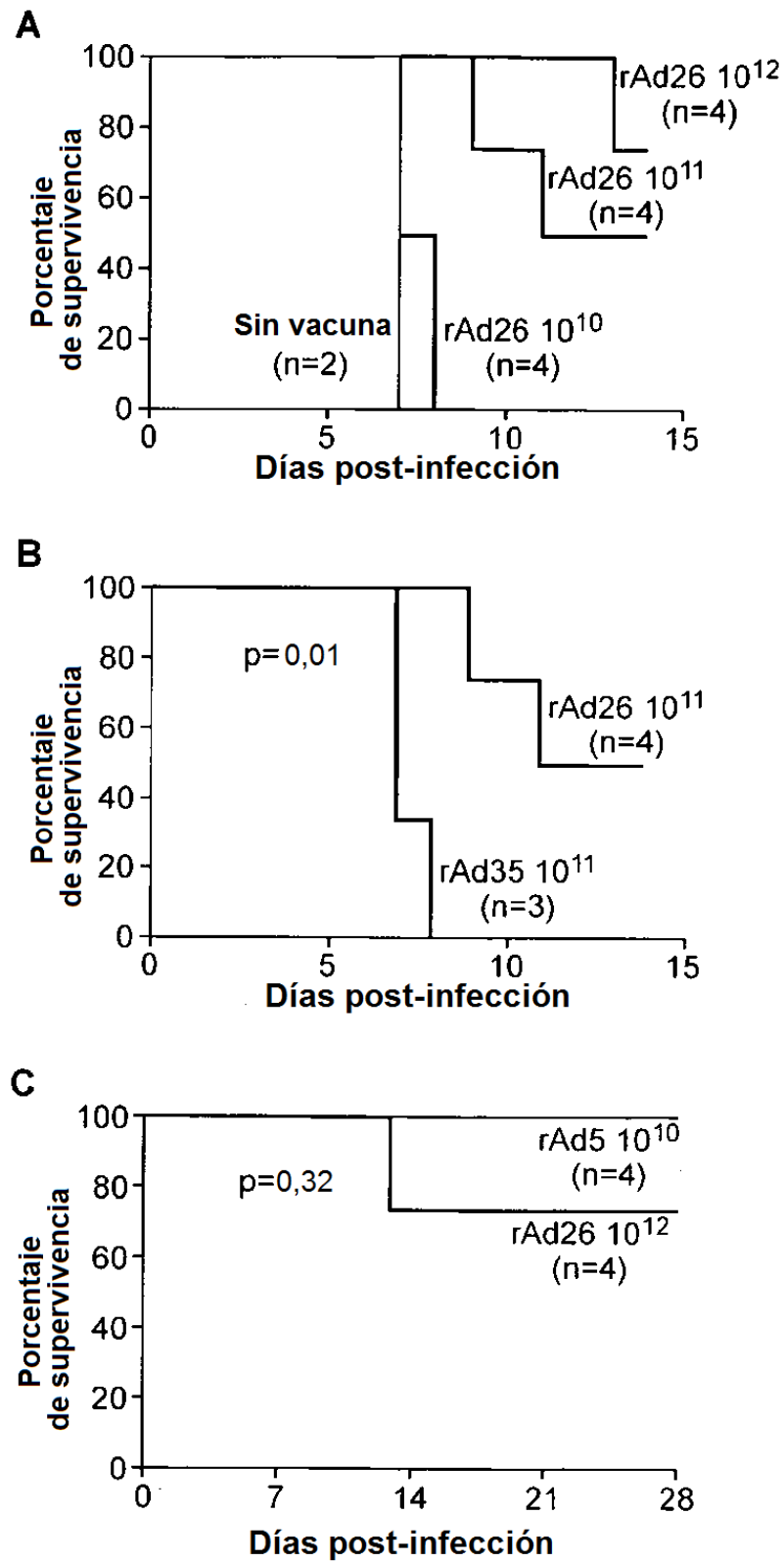


FIG. 5

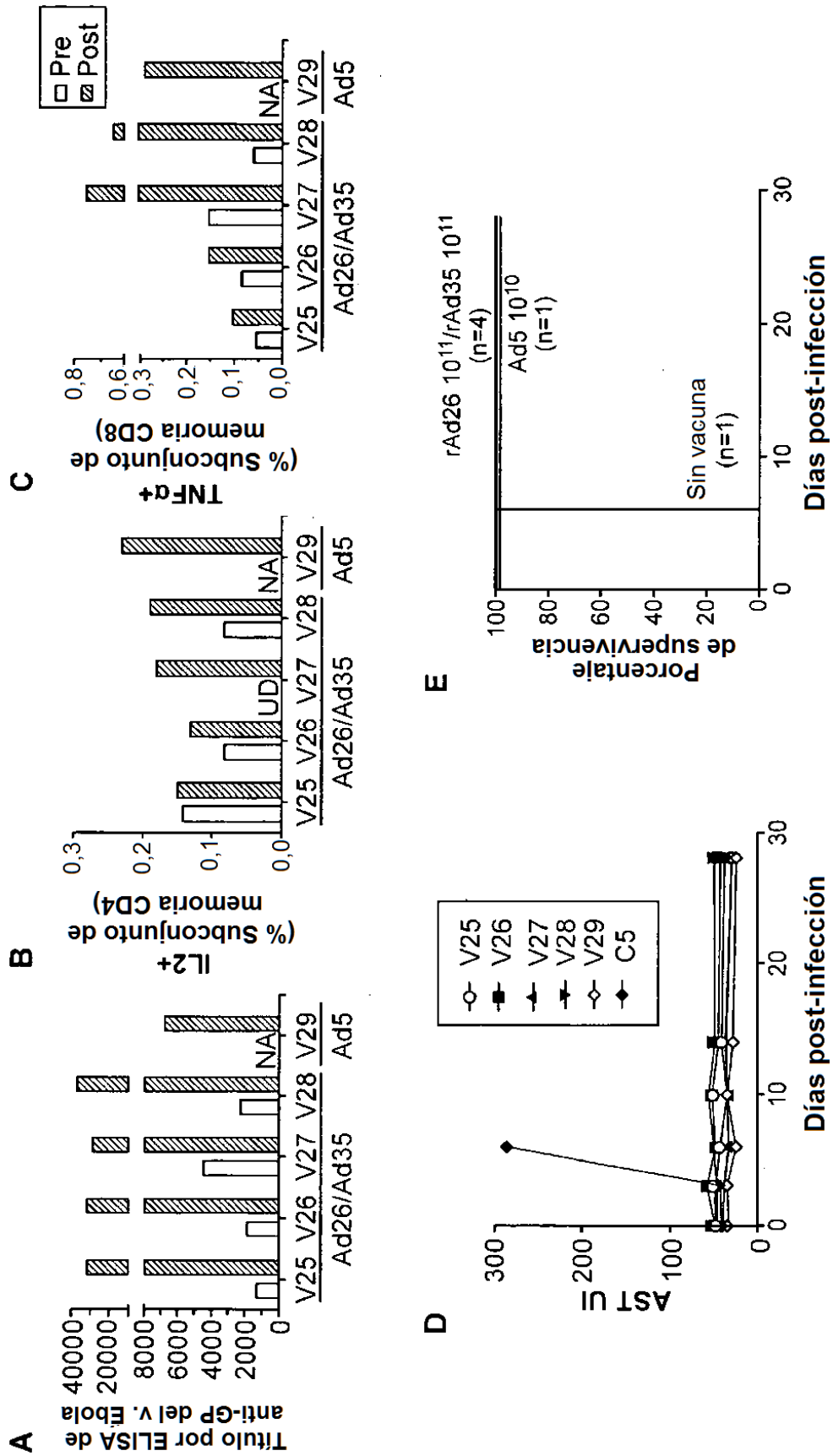


FIG. 6