



ELSEVIER

# Vacunas

[www.elsevier.es/vac](http://www.elsevier.es/vac)


## Artículo especial

# Situación actual de las vacunas frente al virus del Ébola



CrossMark

**J. Reina\* y A. Iñigo**
*Unidad de Virología, Hospital Universitario Son Espases, Palma de Mallorca, España*
**INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO**
**Historia del artículo:**

Recibido el 13 de mayo de 2015

Aceptado el 1 de julio de 2015

On-line el 30 de julio de 2015

**Palabras clave:**

Virus Ébola

Vacunas

Vector adenoviral

Virus de la estomatitis vesicular

**RESUMEN**

La actual epidemia de enfermedad por el virus Ébola ha establecido la necesidad de desarrollar algún tipo de vacuna efectiva frente a este virus. La utilización de la misma permitiría proteger no solo a la población de elevado riesgo (personal sanitario), sino a toda la población sin contacto previo con el virus.

Frente al Ébola existen 2 tipos de vacunas, las no replicativas (inactivadas, proteínas de fusión, replicones y de ADN) que facilitan la interacción entre el antígeno viral (la glucoproteína GP) y el sistema inmune. Las vacunas replicativas se basan en la inserción del gen GP del virus Ébola en diferentes vectores virales replicativos. Así se han utilizado inicialmente como vectores el virus de la parainfluenza, el de la rabia y el citomegalovirus. Sin embargo, las 2 vacunas recombinantes que han mostrado mayor eficacia protectora utilizan adenovirus recombinantes (serotipos 3 y 5) y el virus de la estomatitis vesicular recombinante.

Ambos tipos de vacunas parecen inducir preferentemente inmunidad humoral y/o celular, pero parecen ser las vacunas del futuro. Especialmente la vacuna cAd3, que en un ensayo clínico reciente en fase I, ha mostrado una escasa reactogenicidad y una intensa inmunogenicidad, aunque dependiente de la dosis.

La existencia futura de estas vacunas obliga a plantearse cuál será la mejor estrategia vacunal y quién se hará cargo de los costes de administración y distribución.

© 2015 Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

**Current status of vaccines against Ebola virus**
**ABSTRACT**

The current epidemic of Ebola virus disease has established the need to develop some kind of effective vaccine against this virus. The use of the vaccine would protect not only the high-risk population (health workers) but also all those people without previous contact with the virus.

Vaccines against Ebola virus are classified in two types, non-replicating (inactivated, fusion proteins and DNA replicons) that facilitate interaction between viral antigen (glycoprotein

**Keywords:**

Ebola virus

Vaccines

Adenoviral vector

Vesicular stomatitis virus

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [jorge.reina@ssib.es](mailto:jorge.reina@ssib.es) (J. Reina).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.vacun.2015.07.002>

1576-9887/© 2015 Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

GP) and the immune system. Replicative vaccines are based on the insertion of Ebola virus GP gene in different replicative viral vectors. So were initially used as vectors parainfluenza virus, the rabies and cytomegalovirus. However the two recombinant vaccines have shown greater protective efficacy are recombinant adenovirus (serotypes 3 and 5) and recombinant virus vesicular stomatitis.

Both types of vaccines appear to preferentially induce humoral and/or cellular, but would be vaccines of the future. CAd3 vaccine especially in a recent phase I clinical trial has shown poor reactogenicity and intense immunogenicity, but dose-dependent.

The future existence of these vaccines must raise what is the best vaccination strategy and who will pay for the costs of administration and distribution.

© 2015 Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

## Introducción

Los filovirus pertenecen a la familia Filoviridae y son unos virus con un genoma ARN monofilar no segmentado de unas 19.000 bases. Son virus de morfología filamentosa y un diámetro medio de unos 80 nm y una longitud de hasta 14.000 nm. El genoma está formado por 7 genes dispuestos en el orden 3'-nucleoproteína (NP)-proteína viral (VP35)-VP40-glucoproteína (GP)-VP30-VP24-L (ARN-polimerasa)-5'<sup>1</sup>. La VP40 es la proteína de matriz y participa en la formación de las partículas virales. La glucoproteína (GP) es la proteína clave y esencial en la interacción del virus con las células (unión al receptor celular), el componente antigenético más externo y el inductor de las respuestas inmunes humorales y celulares en el huésped infectado<sup>1</sup>.

Las epidemias de virus hemorrágicos que se producen periódicamente en África representan un importante problema de salud pública, especialmente en un contexto sanitario precario. Las causadas por el virus Ébola (EBO) representan un importante reto sanitario para el África subsahariana, ya que la mortalidad de este virus ronda el 90% en muchas epidemias. Las condiciones especiales de insalubridad y escasas medidas sanitarias de estos países favorecen la rápida y descontrolada transmisión y expansión de este virus<sup>1-3</sup>.

En los últimos 40 años, 3 especies del género *Ebolavirus* han causado brotes epidémicos de fiebres hemorrágicas en los países africanos: el virus Ébola-Zaire (EBOZ), el Ébola-Sudán (EBOS) y el Ébola Bundibugyo. Los países clásicamente afectados, zonas endémicas, han sido la República Democrática del Congo, Sudán, Gabón y Uganda. Una cuarta especie, el Ébola Reston, ha circulado por Filipinas y causa solo infecciones en primates no humanos. La quinta especie, designada como virus Ébola-Tai Forest, solo se ha detectado en un ser humano infectado por su contacto con un chimpancé en Costa de Marfil<sup>1,4</sup>.

La epidemia más reciente de enfermedad por el virus Ébola se inició en diciembre de 2013, ha afectado masivamente a 3 países del África occidental (Guinea Conakry, Liberia y Sierra Leona) y se han descrito algunos casos en países del entorno (Nigeria, Senegal o Mali). Esta epidemia está causada por el virus EBOZ, genéticamente relacionado con el EBOZ endémico de la República Democrática del Congo (antiguo Zaire), aunque con características propias que permiten diferenciarlo<sup>4-6</sup>.

Hasta enero de 2015 se habían producido 21.296 casos confirmados y 8.429 fallecidos por el virus EBOZ (mortalidad del 39,5%)<sup>5</sup>.

Aunque frente a una epidemia de esta magnitud las principales medidas de actuación son epidemiológicas (vigilancia, contingencia y aislamiento), la falta de fármacos antivirales específicos y vacunas protectoras ha obligado a utilizar medidas experimentales<sup>7</sup>. Por ello se hace urgente el desarrollo de una vacuna eficaz y protectora frente a la infección por el virus EBOZ que podría utilizarse para proteger a las personas de riesgo y a las poblaciones todavía no expuestas al virus<sup>8</sup>.

Existen diferentes escenarios epidemiológicos en los que la vacunación frente al Ébola puede ser necesaria. El más evidente sería la vacunación sistemática de la población que viviera en todas las áreas afectadas y reconocidas con presencia del propio virus. Otra posibilidad sería el control de un determinado brote epidémico, de modo que la vacunación protegiera a las personas todavía no afectadas o implicadas en él (vacunación en círculo); sin embargo, para conseguir una máxima eficacia protectora debería utilizarse una vacuna que determinase inmunidad en una sola dosis y que el intervalo en su obtención fuera lo más corto posible. Otra posibilidad sería la vacunación de las personas con un elevado riesgo profesional de infectarse, especialmente todo el personal sanitario, y los investigadores que trabajan directamente con el virus. En esta situación no existe una urgencia de inmunidad y podría realizarse una vacunación en varias dosis para obtener una inmunidad duradera y prolongada<sup>3,9-11</sup>.

## Inmunógenos

Para la elaboración de una vacuna es preciso conocer las estructuras y epítopos antigenicos del elemento a vacunar y su capacidad de respuesta inmune. El principal elemento inductor de esta inmunidad es la glucoproteína de superficie (GP) que determina la producción protectora de anticuerpos locales y sistémicos<sup>1,10,11</sup>. El resto de estructuras virales (VP40, NP), aunque inducen respuestas inmunes parciales, no son suficientemente protectoras frente a la infección externa<sup>12-14</sup>. Las vacunas eficaces deben inducir tanto una inmunidad humoral (anticuerpos) como celular (células T CD4+ y CD8+)<sup>3,11,14</sup>. En el caso del virus Ébola se conoce que los niveles de IgG son

esenciales en la protección frente al virus, aunque no queda clara la necesidad de que sean anticuerpos neutralizantes los necesarios para este proceso<sup>15,16</sup>.

Sin embargo, existen estudios contradictorios referentes al papel de la inmunidad celular. Así, Sullivan et al.<sup>17</sup>, utilizando modelos animales deplecionados de células T, demostraron que eran los linfocitos CD8+ y no la inmunidad humoral la única necesaria para la protección viral. De todo ello se desprende que los parámetros inmunológicos que se correlacionan con, o que confieren inmunidad protectora son multifactoriales y variables en función de la plataforma vacunal utilizada<sup>18</sup>. Sin embargo, sí hay acuerdo en que la inmunidad de memoria no puede obtenerse sin que se produzcan células T-helper específicas y que se precisan células T CD4+ para inducir una respuesta inmune eficaz<sup>18-20</sup>.

## Modelos experimentales

La mayoría de los filovirus salvajes no son capaces de infectar a los ratones sanos, aunque sí a los inmunodeprimidos, de modo que los modelos animales son difíciles de obtener. Los pases sucesivos en animales envejecidos se han utilizado para la obtención de una cepa de EBOVZ adaptada al modelo murino<sup>21</sup>, de modo que su inoculación en estos animales reproduce las mismas lesiones que se presentan en el ser humano<sup>21,22</sup>. Sin embargo, una de las principales limitaciones de este modelo es la escasa afectación de los sistemas de coagulación, fenómeno muy importante en la patogenia humana<sup>23</sup>. De este modo, aunque los ratones continúan sirviendo como primera línea de evaluación de las nuevas vacunas, su valor predictivo en los primates y humanos es limitado, aunque ninguna vacuna que no sea capaz de proteger a los ratones tendrá eficacia en otros modelos animales. Los cobayos también se han utilizado, aunque la sintomatología no es muy evidente; precisando el desarrollo de cepas adaptadas a este animal<sup>24</sup>. Por razones desconocidas, los resultados obtenidos en estos animales se asemejan mucho más a los que posteriormente puedan obtenerse en otros modelos superiores<sup>11,14</sup>.

Como consecuencia de todo ello, los únicos modelos animales que aseguran resultados fiables y extrapolables al ser humano son los realizados en primates. Estos animales se consideran los únicos en los que se pueden ensayar, con resultados fiables, tanto vacunas como fármacos antivirales. Además, en estos modelos la mayoría de cepas de Ébola provocan una mortalidad del 100%, lo cual permite valorar la eficacia real de cualquier terapia. Para iniciar los ensayos en humanos se hace imprescindible demostrar una eficacia protectora en el 100% de los primates evaluados. Uno de los principales inconvenientes es el mantenimiento y manejo de estos animales y las exigentes medidas de bioseguridad necesarias para este tipo de ensayos<sup>14,25</sup>. El empleo de estos animales en los ensayos vacunales ha establecido el concepto de inmunidad animal, es decir, se extrapolan los datos de seroconversión, nivel y tipo de inmunoglobulinas que los protegen, al ser humano<sup>26</sup>; de este modo se considera que el nivel de anticuerpos alcanzados en ellos son protectores y permiten la supervivencia del animal tras su infección por el virus Ébola<sup>3,10,14</sup>.

## Tipos de vacunas

Las vacunas frente al Ébola pueden clasificarse en 2 grupos: replicativas y no replicativas (inactivadas y de vectores). En el caso de las vacunas con subunidades, el inmunógeno (generalmente la GP viral) se administra en forma de partículas virus-like (VLP) o como proteínas purificadas recombinantes; en las vacunas vectoriales se introduce el ADN que codifica al inmunógeno en un vector viral. Todas las vacunas no replicativas presentan delecciones en los genes esenciales virales para evitar la replicación de los mismos.

Por el contrario, las vacunas replicativas se basan en vectores víricos activos que incorporan a su genoma el gen del inmunógeno; en el caso del virus Ébola, y por razones de bioseguridad, no se han desarrollado vacunas atenuadas del propio virus. Para asegurarse que el virus vectorial no desarrolle su propia enfermedad, acostumbran a tener delecionados algunos genes internos que atenuan su patogenicidad<sup>10,11,14,27</sup>.

### Vacunas no replicativas

#### Vacunas inactivadas

Las primeras vacunas inactivadas frente al Ébola eran preparaciones tratadas con formalina o virus inactivados por el calor y mostraron buena eficacia protectora en el cobaya frente a la cepa salvaje de EBOZ<sup>28</sup>. Sin embargo, fueron incapaces de proteger a los primates a pesar de desarrollar anticuerpos neutralizantes específicos<sup>29</sup>.

#### Proteína de fusión EBOZ-GP-Fc

La mayoría de los estudios demuestran que la GP de los filovirus es el principal inmunógeno y por lo tanto la diana del sistema inmune. Partiendo de este concepto, se planteó inicialmente utilizar la GP sola como elemento vacunal (al igual que la hemaglutinina en la gripe). Para obtener una mayor eficiencia se creó un vector de expresión que presentara la porción Fc de la IgG humana fusionada con la GP del virus Ébola<sup>25,30</sup>. Esta estructura GP-Fc inducía una respuesta inmune tanto humoral como celular, y los ratones vacunados con la EBOZ-GP-Fc presentaron un 90% de protección frente a la infección viral<sup>30</sup>. Aunque no se han realizado estudios en otros animales, confirman la importancia de la GP en la respuesta inmune protectora.

#### Replicones

Pushko et al.<sup>31</sup> realizaron estudios mediante el empleo de replicones con los alfavirus; así, los genes estructurales del virus de la encefalitis equina venezolana se sustituyen por la GP del EBOZ y el replicón resultante se expresó en un vector ARN que se empaquetó en unas estructuras VLP. Estas vacunas se mostraron altamente protectoras en los cobayos pero no en los primates. Recientemente se han repetido los ensayos utilizando el virus Kunjin, obteniéndose una protección del 25-86%, dependiendo de la dosis y del inmunógeno utilizado<sup>32</sup>. Sin embargo, no se han evaluado en primates.

#### Vacunas de ADN

Las vacunas de ADN con el virus Ébola se han mostrado protectoras en los modelos murinos y de cobayas. Los primeros

estudios se realizaron en plásmidos que expresaban los genes NP y GP del virus EBOZ<sup>33,34</sup>. Sin embargo, precisan de 4 o 5 dosis para alcanzar el 100% de protección en el ratón, aunque si se aumenta la dosis viral, son suficientes 3 dosis, al igual que ocurre en los ensayos en cobayas<sup>11,20</sup>.

En los primates se han ensayado vacunas de ADN en combinación con un adenovirus recombinante replicación-deficiente que expresaba la GP del EBOZ; con este sistema se consiguió por primera vez una protección del 100% de los primates no humanos<sup>20</sup>. Martin et al.<sup>34</sup> observaron en el ensayo clínico fase I que esta vacuna era segura e inducía, después de 3 dosis, la producción de anticuerpos específicos y una respuesta tipo células T en los voluntarios humanos<sup>34</sup>.

Sarwar et al.<sup>35</sup> han realizado un ensayo clínico en fase I para evaluar la seguridad y la inmunogenicidad de una vacuna de ADN frente al Ébola que contiene la GP salvaje (GPwt) de los virus Ébola y Marburg. La vacuna se administró a la dosis de 4 mg intramuscular a las semanas 0, 4 y 8 y una dosis de recuerdo a la semana 32. Los resultados han demostrado que la vacuna era segura y bien tolerada, con escasos efectos adversos. El 80% de los pacientes desarrollaron anticuerpos específicos (título >30 µg/ml) a la semana 12. La cuarta dosis determinó un incremento significativo de los títulos previamente obtenidos en esa semana. Se observó que la respuesta humoral predominaba sobre la celular, y que los T/CD4+ eran superiores a la respuesta en T/CD8+<sup>35</sup>.

Recientemente Kibuuka et al.<sup>36</sup> han comunicado los resultados obtenidos sobre seguridad e inmunogenicidad frente a los virus EBOZ y EBOM mediante la administración de una vacuna de ADN/GP (RV 247). Los sujetos recibieron 3 dosis (0,4 y 8 s) de la vacuna monovalente o ambas a la vez. El 57% de los sujetos presentaron anticuerpos y respuesta celular T frente a las 2 vacunas (rango 43-63%). Este estudio realizado en población africana demuestra la posible utilidad de este tipo de vacunas, aunque los resultados deberían considerarse insatisfactorios.

#### Vacunas de subunidades

Las vacunas de subunidades ensayadas frente al Ébola han sido tanto las formadas por estructuras víricas aisladas (GP) obtenidas por recombinación o las estructuras VLP. La primera vacuna de este tipo era una GP clonada en un baculovirus que se administraba por vía subcutánea en cobayas y que obtuvo un 50% de protección tras 3 dosis<sup>37</sup>. Estos primeros intentos mostraron la poca eficacia protectora en otros modelos animales y en primates y fueron desechados<sup>2,3</sup>.

Las estructuras VLP, que utilizan la proteína de matriz VP40 de estabilizadora, sí han manifestado una eficacia prometedora, ya que se han mostrado protectoras en los roedores y en los primates después de 3 dosis; sin embargo, en el ratón se han mostrado muy dependientes de la dosis<sup>38-40</sup>. Su preparación en células de insectos y la utilización de los baculovirus ofrecen un incremento de las posibilidades de inmunización<sup>41</sup>. Se ha comprobado que las estructuras vacuulares frente al virus Ébola (eVLP) y al virus Marburg (mVLP) inducen inmunidad protectora en ratones, aunque dependiente de la dosis, lo cual obliga a prolongar el período de inmunidad<sup>41</sup>.

#### Ebolavirus deficientes en replicación

Las técnicas de genética reversa permiten obtener Ebolavirus genéticamente modificados; de este modo se ha obtenido un virus que contiene el gen activador transcripcional VP30 deletreado y sin capacidad de replicación (rEBOΔVP30)<sup>40</sup>. Para que este virus pueda crecer en cultivo celular, el VP30 se ha insertado en modo trans, de modo que aunque se replique en las células permisivas no produzca una progenie infecciosa (al carecer de la VP30), limitando su ciclo biológico. Este tipo vacunal demostró capacidad para proteger al 100% de los ratones y cobayas después de 2 dosis, aunque no se probó en los primates no humanos<sup>42</sup>. Sin embargo, debido a que el rEBOΔVP30 todavía contiene más del 95% del genoma original del EBOZ, se presentan múltiples dudas sobre la auténtica seguridad de la vacuna y la posibilidad de reversión al estado salvaje. Aunque estudios experimentales de recombinación con cepas salvajes no han mostrado la recuperación de la VP30, y por lo tanto, de virus infectivos, se decidió no utilizar este sistema vacunal más allá de los ensayos de laboratorio<sup>11,14</sup>.

#### Vacunas replicativas

##### Virus parainfluenza tipo 3 recombinante

El virus parainfluenza tipo 3 se utilizó como plataforma vacunal frente al Ébola. De este modo, Bukreyev et al.<sup>43,44</sup> insertaron una zona transcripcional codificadora de la GP del EBOZ entre los genes P y M del virus parainfluenza. El virus recombinante rHPIV3/GP mostró una protección del 100% en cobayas con una dosis y el 100% de los primates después de 2 dosis, sin signos de infección ni viremia en estos animales<sup>44</sup>.

Al igual que ocurre con el adenovirus, este virus parainfluenza es muy prevalente entre la población general y plantea de nuevo los problemas de la inmunidad previa. Para intentar eliminar este fenómeno se creó una segunda generación de rHPIV3 en la que los genes originales HN y F se delecionaban y el gen GP del EBOZ ocupaba su función (rHPIV/ΔHN-F/GP)<sup>44</sup>. El único ensayo clínico realizado mostró en primates protección e inmunidad duradera, pero no se ha decidido su paso al ser humano<sup>44,45</sup>.

#### Virus de la rabia

El virus de la rabia está genéticamente y filogenéticamente muy relacionado con el VSV, por ello se ha probado su utilidad frente al Ébola. Esta posibilidad es muy interesante, ya que la cepa de virus de la rabia utilizada es la que se emplea en la vacunación frente a esta enfermedad. Para obtener una vacuna contra el Ébola, la cepa de la rabia se atenuó introduciendo unas mutaciones puntuales en el gen GP del virus, destinadas a bloquear su neurovirulencia. La GP del EBOZ se introdujo entre los genes N y P, de modo que las vacunas resultantes retuvieran la propia GP rágica (BNSP333-GP y BNSPΔG-GP)<sup>46,47</sup>. Una sola dosis de esta vacuna protegía al 100% de los ratones sometidos posteriormente a la infección. También se han desarrollado vacunas con el virus de la rabia modificadas genéticamente para contener la GP del Ébola. Así se dispone de 2 vacunas vivas atenuadas (RV-GP y RVΔG-GP) con capacidad replicativa que inducen una intensa respuesta frente al virus de la rabia y del Ébola<sup>46</sup>. No se han comunicado nuevos resultados en otras especies animales.

### Citomegalovirus

Tsuda et al.<sup>48</sup> en 2011 comunicaron una posible vacuna frente al Ébola basada en el citomegalovirus (CMV). Este virus se caracteriza por establecer una infección persistente en el huésped humano; es un virus altamente inmunogénico y la utilización de una forma recombinante (rCMV) que expresa la NP y GP del EBOZ podría proteger a los animales de la infección natural<sup>48</sup>. Sin embargo, uno de los principales problemas que plantea esta plataforma es que el CMV es un virus huésped-específico, de modo que solo podría utilizarse el virus humano para su manipulación; además es un virus rápidamente adquirido en la infancia por los humanos, y la mayoría de ellos ya lo presentarían antes del proceso vacunal. Por todo ello se desestimó esta posibilidad teórica de su utilidad clínica<sup>10,11,14</sup>.

### Adenovirus recombinantes

Las vacunas con adenovirus recombinantes se utilizaron por primera vez como refuerzo (*boost*) en combinación con las vacunas de ADN y con otros virus (hepatitis C o rabia)<sup>49</sup>. A pesar de que esta estrategia era capaz de proteger al 100% de los primates expuestos al Ébola, se precisaba un período superior a los 6 meses para completar la inmunización. Cuando se utilizó la vacuna recombinante sola se obtuvo un 100% de protección después de 4 semanas de la inoculación, aunque la tasa de anticuerpos era algo inferior a la obtenida en el proceso combinado. En este tipo de vacuna se ha observado que la dosis vacunal (concentración viral) era esencial en la obtención en la eficacia protectora, de modo que concentraciones inferiores a  $1 \times 10^{10}$  no consiguen resultados aceptables<sup>50,51</sup>.

Diferentes estudios iniciales demostraron que las vacunas con adenovirus recombinantes producían protección frente a diferentes cepas del virus Ébola. Así, una de ellas, que expresa la GP de los virus Ébola Zaire y Sudán, era capaz de proteger el 100% de los primates con una sola dosis vacunal<sup>52</sup>. Ledgerwood et al.<sup>53</sup> comprobaron en 2010, en un ensayo en fase I, que la vacuna Ad5-GP era segura (no reactogénica) e inmunógena, induciendo una intensa respuesta en anticuerpos específicos y células T entre el 25-45% de los primates, dependiendo de la dosis administrada y de la especie de *Ebolavirus* utilizado.

Uno de los principales problemas de las vacunas que utilizan adenovirus es la posible existencia de inmunidad previa frente a los mismos. La vacuna Ad5-GP utiliza el serotipo 5 de los adenovirus, frente al cual entre el 60-90% de los adultos, dependiendo del país, poseen anticuerpos protectores<sup>54</sup>. En los modelos murinos la preexistencia de inmunidad frente al Ad5 ha dificultado la obtención de protección frente al Ébola, pero además, en los ensayos clínicos, las personas que eran seropositivas frente a este serotipo desarrollaban una respuesta inmune frente al Ébola muy inferior a la obtenida en personas naïve<sup>54,55</sup>. Para solucionar este problema se han planteado diferentes estrategias, como aumentar el número de dosis vacunales, en la vía de administración o cambiar el serotipo del adenovirus. También se ha propuesto la modificación del cápside proteico del adenovirus 5 a nivel genético para crear un hexón químerico adenoviral y su posterior modificación con polímeros biocompatibles para protegerlo del sistema inmune de las personas con anticuerpos previos<sup>55,56</sup>.

La utilización de serotipos poco frecuentes de adenovirus sería una posible solución a la inmunidad previa. Así, Geisbert et al.<sup>57</sup> han elaborado un vector vacunal basado en el rAd35-EBOZ-GP que es capaz de inducir una potente respuesta inmunológica frente al Ébola. Tanto la concentración de anticuerpos como la inducción de inmunidad celular tipo T se han mostrado muy superiores a las obtenidas con el serotipo 5. Han comprobado asimismo que el serotipo 26 (rAd26-EBOZ-GP) también obtiene resultados protectores, aunque algo inferiores a los detectados con el serotipo 35. Además, la utilización de estos serotipos no humanos permitiría analizar de forma indirecta la respuesta inmune frente a ellos comparada con la obtenida frente al propio virus Ébola<sup>54</sup>.

Esta última propuesta parece haber obtenido los mejores resultados. Así, los últimos ensayos se han realizado con el adenovirus serotipo 3 (Ad3), frente al cual la población humana apenas presenta inmunidad previa<sup>54</sup>. Los primeros estudios parecen indicar que esta vacuna bivalente (Zaire y Sudán) obtiene protección inmunológica, pero no con la misma rapidez que la obtenida con la vacuna rVSV, precisando su suplementación con una dosis de la vacuna con el virus Ankara-GP para conseguir una inmunidad perdurable<sup>52,57,58</sup>.

La mayoría de vacunas estudiadas se administran por vía intramuscular. Sin embargo, algunos estudios han analizado la posibilidad de utilizar otras vías de administración. Este concepto se basa en el hecho de que la infección por el virus Ébola se transmite directamente por contacto de mucosas, de modo que la presencia de una respuesta inmune específica y eficaz en estos territorios serían objetivos clave de una vacuna de futuro<sup>52,55</sup>.

Choi et al.<sup>59</sup> han realizado un estudio sobre la eficacia de una vacuna con el Ad5 administrada por vía sublingual. Los resultados obtenidos son muy esperanzadores, aunque han presentado de nuevo 2 problemas: la necesidad de una elevada carga viral en la vacuna y la escasa respuesta en las personas con anticuerpos previos frente al adenovirus utilizado.

De este modo, Choi et al.<sup>60</sup> han utilizado en primates una vacuna basada en el adenovirus serotipo 5 (Ad-CAGoptZ-GP) para analizar los resultados inmunológicos obtenidos tras su administración sublingual o intranasal. La administración de una dosis única comportó un importante incremento de las poblaciones celulares T CD8+ y CD4+ y de los anticuerpos específicos tanto locales (mucosa nasal y lingual) como sistémicos. Sin embargo, al compararlos con los obtenidos por la vía intramuscular, la sublingual se consideró bastante inferior y no totalmente protectora.

En estos estudios se ha demostrado que la respuesta en anticuerpos específicos es muy variable dependiendo de las rutas de administración y del modelo animal utilizado. Pero partiendo del hecho de que las células T desempeñan un papel esencial en la activación de las células B, productoras de anticuerpos, parece evidente que la activación subóptima de la respuesta multifuncional de células T CD8+, asociado a una concentración disminuida de los isótipos IgG1 GP-específicos, determina una menor respuesta inmune y una baja supervivencia frente a la infección por el virus Ébola<sup>56</sup>.

Ledgerwood et al.<sup>61</sup> han elegido una vacuna basada en el adenovirus del chimpancé serotipo 3 (cAd3-EBO) para realizar un ensayo clínico en fase I. La elección de este vector se basaba en la demostración previa de la eficacia de esta

vacuna en primates no humanos infectados a las 5 semanas posvacuna y a la eficacia parcial a los 10 meses. Además, en estos animales la administración posterior de un refuerzo con la vacuna Ankara (MVA) determinaba una protección permanente más allá de los 10 meses<sup>61</sup>.

El ensayo clínico (VRC 207)<sup>61</sup> tenía como objetivo determinar la seguridad, los efectos secundarios (reactogenicidad) y la inmunogenicidad de la vacuna bivalente que contenía la GP del virus Ébola Zaire y Ébola Sudán. Se hicieron 2 grupos, y a uno de ellos se le administró, por vía intramuscular (deltoides), una vacuna con  $2 \times 10^{10}$  pfu y a otro una vacuna con  $2 \times 10^{11}$  pfu (estudio de carga antigenica). Los niveles de anticuerpos específicos se calcularon mediante un ELISA; de modo que una respuesta positiva se estableció como un incremento en el título sérico de como mínimo el 90% de la concentración efectiva (EC90)<sup>50</sup>. También se estableció la respuesta en células T y se cuantificaron las principales citoquinas provocadas por la vacuna<sup>35</sup>.

Los resultados demostraron que las tasas y la severidad local y sistémica, incluyendo la fiebre, eran similares a las detectadas en otros estudios en los que se habían utilizado otros vectores adenovirales<sup>53</sup>. Las respuestas inmunes, humoral y celular, detectadas en los sujetos fueron similares a las consideradas como protectoras frente al Ébola en los primates no humanos<sup>26,50,58</sup>. Sin embargo, se observó una diferencia significativa en función de la carga vacunal (dependiente de la dosis) en la inducción de células T CD8+/GP-específicas. Así, el 70% del grupo vacunado con  $2 \times 10^{11}$  pfu presentaron este tipo de células a niveles protectores, frente a tan solo el 20% de los vacunados con baja carga viral<sup>61</sup>. Las tasas de anticuerpos frente a la GP de los virus Ébola y Sudán fueron muy parecidas y se demostró la eficacia de la vacuna bivalente ampliando el espectro de protección global, aunque se ha elaborado una forma monovalente solo dirigida frente al EBOZ<sup>27,61</sup>.

Dado que se había comprobado la menor respuesta de las vacunas cAd5 por la presencia de inmunidad previa<sup>53,62</sup>, se analizaron los títulos basales frente al Ad3 de las personas que iban a ser vacunadas y se observó que eran muy inferiores a los dirigidos contra el Ade5, comprobándose, además, que la presencia de los mismos no influyó en la respuesta humoral específica frente al virus Ébola. Sin embargo, sí se pudo detectar una menor respuesta en células T CD8+ en los sujetos con inmunidad previa frente al Ad3, debiendo valorarse este resultado en grupos más amplios<sup>27,61</sup>.

A partir de estos resultados positivos se planea pasar a la fase II con inmunización de grupos naïve y personal sanitario de riesgo; si los resultados fueran aceptables, probablemente se podría iniciar una vacunación mucho más amplia y masiva en países todavía no infectados por el virus Ébola<sup>27</sup>.

#### Virus de la estomatitis vesicular recombinante

El virus de la estomatitis vesicular (VSV) es el miembro prototípico de la familia Rhabdoviridae que presenta un genoma ARN lineal simple formado solamente por 5 genes. Su sencillez genética lo ha convertido en un excelente candidato a vector de expresión viral (capacidad de expresión de genes virales externos)<sup>63</sup>. El VSV además crece a elevados títulos en gran variedad de líneas celulares, pudiendo ser propagado y fabricado en grandes cantidades. Este virus induce importantes

respuestas inmunológicas humorales y celulares in vivo y presenta una escasa seroprevalencia en la población humana<sup>64</sup>.

La plataforma vacunal del VSV recombinante (rVSV) se basa en los sistemas de genética reversa aplicados a la cepa VSV serotipo Indiana. Fue desarrollada por Jones et al.<sup>65</sup> en 2005 y representó la primera vacuna replicativa frente al Ebolavirus, con eficacia protectora en primates, basada en el rVSV. En este virus la GP del VSV se reemplazó por la GP del EBOZ, y el virus resultante (rVSV/ΔG/GP) demostró un 100% de protección en los primates después de una sola dosis vacunal. No pudo detectarse replicación viral ni por aislamiento ni por RT-PCR en los primates vacunados después de administrar el virus infectivo; además, los animales no presentaron ningún signo ni síntoma de infección o enfermedad<sup>64,65</sup>.

Debido a que este virus es replicación competente, se precisa una pequeña dosis viral ( $1 \times 10^7$  pfu) frente a la vacuna con adenovirus no replicativos ( $1 \times 10^{10}$  pfu). En algunos animales se pudo observar una viremia transitoria del rVSV, aunque no se pudo detectar ningún efecto adverso. Por otro lado, la neurovirulencia, que podría ser un problema potencial del VSV salvaje, no se producía en los primates inoculados con el rVSV intratecalmente. Tampoco se detectaron efectos adversos en animales infectados por el simian immunodeficiency virus (SIV), a pesar de estar profundamente inmunodeprimidos. Por lo tanto, la utilización de las vacunas basadas en el rVSV parecía ser una de las candidatas a los ensayos clínicos en humanos. El estudio de Marzi et al.<sup>66</sup> ha demostrado que la administración de una segunda dosis de rVSV-S-GP/VP40 incrementa la protección no solo frente al EBOZ sino además frente a otras especies de filovirus como el EBOS y Marburg. También han observado que la protección cruzada obtenida por la vacuna varía en función del modelo animal utilizado. Los resultados obtenidos en el cobaya muestran un mayor valor predictivo que los del modelo murino. De modo que las vacunas bivalentes deberían ensayarse siempre en el primer modelo antes de su pase a los primates. Aunque el primer objetivo vacunal es la obtención de inmunidad protectora frente a la especie de filovirus prevalente en una determinada región, la generación de inmunidad cruzada sería un valor añadido a esta vacuna, pero no su objetivo esencial<sup>64,66</sup>.

En este estudio también se pudo comprobar que aunque la vacuna EBOZ-NP, basada en el gen de la nucleoproteína viral, había mostrado propiedades inmunogénicas en otras plataformas (VLP o vectores adenovirales)<sup>66,67</sup>, cuando se ensayaba en el modelo del cobaya en su forma rVSVwt/S-NP no mostraba apenas eficacia protectora. Previamente Sullivan et al.<sup>50</sup> habían comunicado una observación parecida con la inclusión del EBOZ-NP en un vector adenoviral en primates. Estos y otros estudios determinaron que la NP no era suficiente para la obtención de una verdadera inmunidad protectora y se iniciaron los estudios con la GP viral<sup>66-68</sup>.

Wong et al.<sup>69</sup> han presentado un estudio en roedores en el que demuestran la eficacia protectora frente al virus EBOZ de la vacuna VSVΔG/EBOVGP administrada por vía intramuscular. Se obtuvo, sin embargo, solo una protección del 80% a los 12 meses posvacunación, a pesar de que los niveles séricos específicos presentaban el nivel considerado protector. Por su parte, Wang et al.<sup>70</sup> han analizado la utilización de tan solo un fragmento del determinante antigenico de la GP, el designado como MFL (posición entre los aminoácidos 393-556), que

contiene el lazo de fusión interna del virus. Este tipo de vacuna ha mostrado capacidad para inducir respuesta inmune frente al virus EBOZ y EBOS, aunque no se ha establecido su capacidad protectora frente a la infección experimental. De este modo, las plataformas basadas en el rVSV pueden ser monovalentes (con posible reacción cruzada) o bivalentes y contener la GP de diferentes especies de filovirus. Así, en varios estudios se ha comprobado que estas vacunas bivalentes protegen de forma simultánea tanto al EBOZ como al EBOS<sup>71-73</sup>.

Además de la vacunación primaria, la vacuna rVSV ha mostrado una elevada eficacia en la vacunación postexposición al virus Ébola; de este modo, el 100% de los hámsteres vacunados a las 24 h de exposición al virus no desarrollaban la enfermedad<sup>74,75</sup>. En los cobayas y primates las tasas de supervivencia son algo menores (83-50%) cuando la vacuna se administra entre 30-60 min postexposición<sup>74,75</sup>, aunque podría ser suficiente tras un accidente humano con contacto directo con el virus Ébola.

Los primeros ensayos clínicos en fase I de una vacuna rVSV-EBOZ debieron suspenderse temporalmente a finales de 2014 por la excesiva reactogenicidad asociada (artralgias y mialgias). Es necesario reformular o reevaluar este tipo de vacuna para iniciar de nuevo los ensayos en humanos<sup>76</sup>.

## Conclusiones

En estos momentos están en marcha al menos 2 posibles vacunas frente al Ébola basadas en vectores virales (Ade3 y rVSV), y los resultados de los ensayos clínicos probablemente estén disponibles en los próximos meses. Sin embargo, existen bastantes dudas sobre la administración rutinaria de estas vacunas. Así, Lee et al.<sup>76</sup> reflexionan sobre estas vacunas y se plantean las siguientes cuestiones: ¿Quién debe y quién no debe vacunarse?, ¿cómo conseguir que la vacuna llegue y pueda administrarse adecuadamente a la población general en unos sistemas sanitarios ineficientes?, ¿cuál es el margen de seguridad aceptable para su administración masiva? y ¿quién se encargará de los costes de los programas de vacunación? Todas estas preguntas, y algunas otras<sup>77</sup>, deberían empezar a responderse antes de que se disponga de una vacuna eficaz, ya que el futuro sanitario de las zonas afectadas podría alterarse con su implementación.

## Conflictos de intereses

Los autores no presentan ningún conflicto de intereses.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Feldmann H, Sanchez A, Geisbert TW. Filoviridae: Marburg and Ebola viruses. En: Knipe DM, Howley PM, editores. *Fields Virology* (6th). Philadelphia, USA: Wolters Kluwer; p. 923-56.
2. Feldmann H, Geisbert TW. Ebola haemorrhagic fever. *Lancet*. 2011;377:849-62.
3. Fausther-Bovendo H, Mulangu S, Sullivan NJ. Ebolavirus vaccines for humans and apes. *Curr Opin Virol*. 2012;2:324-9.
4. Baize S, Pannetier D, Oestereich L, Rieger T, Koivogui L, Magassouba N, et al. Emergence of Zaire Ebola virus disease in Guinea. *N Engl J Med*. 2014;371:1418-25.
5. World Health Organization (WHO). Global Alert and Response (GAR). Ebola Situation Report [consultado 14 Ene 2015] Disponible en: <http://www.who.int/csr/disease/ebola/situation-reports/en/>
6. Gire SK, Goba A, Andersen KG, Sealfon RS, Park DJ, Kanneh L, et al. Genomic surveillance elucidates Ebola virus origin and transmission during the 2014 outbreak. *Science*. 2014;345:1369-72.
7. Frieden TR, Damon I, Bell BP, Kenyon T, Nichol S. Ebola 2014-new challenges, new global response and responsibility. *N Engl J Med*. 2014;371:1177-80.
8. Kanapathipillai R, Henao-Restrepo AM, Fast P, Wood D, Dye C, Kieny MP, et al. Ebola vaccine-an urgent international priority. *N Engl J Med*. 2014;371:2249-51.
9. Xu L, Sanchez A, Yang Z, Zaki SR, Nabel EG, Nichol ST, et al. Immunization for Ebola virus infection. *Nat Med*. 1998;4:37-42.
10. Richardson JS, Dekker JD, Croyle MA, Kobinger GP. Recent advances in Ebolavirus vaccine development. *Hum Vaccine*. 2010;6:439-49.
11. Hoenen T, Groseth A, Feldmann H. Current Ebola vaccines. *Expert Opin Biol Ther*. 2012;12:859-72.
12. Wilson JA, Bray M, Bakken R, Hart MK. Vaccine potential of Ebola virus VP24, VP30, VP35 and VP40 proteins. *Virology*. 2001;286:384-90.
13. Feldmann H, Jones S, Klenk HD, Schmittler HJ. Ebola virus: From discovery to vaccine. *Nat Rev Immunol*. 2003;3:677-85.
14. Marzi A, Feldmann H. Ebola virus vaccines: An overview of current approaches. *Expert Rev Vaccines*. 2014;13:521-31.
15. Takada A, Ebihara H, Jones S, Feldmann H, Kawaoka Y. Protective efficacy of neutralizing antibodies against Ebola virus infection. *Vaccine*. 2007;25:993-9.
16. Marzi A, Engelmann F, Feldmann F, Haberthur K, Shupert WL, Brining D, et al. Antibodies are necessary for rVSV/ZEBOV-GP-mediated protection against lethal Ebola virus challenge in nonhuman primates. *PNAS*. 2013;110:1893-8.
17. Sullivan NJ, Hensley L, Asiedu C, Geisbert TW, Stanley D, Johnson J, et al. CD8+ cellular immunity mediates rAD5 vaccine protection against Ebola virus infection of nonhuman primates. *Nat Med*. 2011;17:1128-31.
18. Blaney JE, Marzi A, Willet M, Papaneri AM, Wirlbach C, Feldmann F, et al. Antibody quality and protection from lethal Ebola virus challenge in nonhuman primates immunized with Rabies virus based bivalent vaccine. *PLoS Pathog*. 2013;9:e1003389.
19. Connolly BM, Steele KE, Davis KJ, Geisbert TW, Kell WM, Jaax NK, et al. Pathogenesis of experimental Ebola virus infection in guinea pigs. *J Infect Dis*. 1999;179:S203-17.
20. Sullivan NJ, Sanchez A, Rollin PE, Yang ZY, Nabel GJ. Development of a preventive vaccine for Ebola virus infection in primates. *Nature*. 2000;408:605-9.
21. Bray M, Davis K, Geisbert T, Schmaljohn C, Huggins J. A mouse model for evaluation of prophylaxis and therapy of Ebola hemorrhagic fever. *J Infect Dis*. 1998;178:651-61.
22. Bray M. The role of the type I interferon response in the resistance of mice to filovirus infection. *J Gen Virol*. 2001;82:1365-73.
23. Bray M, Hatfill S, Hensley L, Huggins JW. Haematological, biochemical and coagulation changes in mice, guinea-pigs and monkeys infected with a mouse-adapted variant of Ebola Zaire virus. *J Comp Pathol*. 2001;125:243-53.
24. Ryabchikova E, Kolesnikova L, Smolina M, Tkachev V, Pereboeva L, Baranova S, et al. Ebola virus infection in guinea

- pigs: Presumable role of granulomatous inflammation in pathogenesis. *Arch Virol.* 1996;141:909-21.
25. Friedrich BM, Trefry JC, Biggins JE, Hensley LE, Honko AN, Smith DR, et al. Potential vaccines and post-exposure treatments for filovirus infections. *Viruses.* 2012;4:1619-50.
  26. Sullivan NJ, Martin JE, Graham BS, Nabel GJ. Correlates of protective immunity for Ebola vaccines: Implications for regulatory approval by the animal rule. *Nature Rev Microbiol.* 2009;7:393-400.
  27. Bausch DG. One step closer to an Ebola virus vaccine. *N Engl J Med.* 2014, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM1414305>.
  28. Lupton HW, Lambert RD, Bumgardner DL, Moe JB, Eddy GA. Inactivated vaccine for Ebola virus efficacious in guinea pig model. *Lancet.* 1980;2:1294-5.
  29. Geisbert TW, Pushko P, Anderson K, Smith J, Davis KJ, Jahrling PB. Evaluation in nonhuman primates of vaccines against Ebola virus. *Emerg Infect Dis.* 2002;8:503-7.
  30. Konduru K, Bradfute SB, Jacques J, Manangeeswaran M, Nakamura S, Morshed S, et al. Ebola virus glycoprotein Fc fusion protein confers protection against lethal challenge in vaccinated mice. *Vaccine.* 2011;29:2968-77.
  31. Pushko P, Bray M, Ludwig GV, Parker M, Schmaljohn A, Sanjeev A, et al. Recombinant RNA replicons derived from attenuated Venezuelan equine encephalitis protect guinea pigs and mice from Ebola hemorrhagic fever virus. *Vaccine.* 2000;19:142-53.
  32. Reynard O, Mokhonov V, Mokhonova E, Leung J, Page A, Mateo M, et al. Kunjin virus replicon-based vaccines expressing Ebola virus glycoprotein GP protect the guinea pig against lethal Ebola virus infection. *J Infect Dis.* 2011;204 Suppl 3:S1060-5.
  33. Vanderzanden L, Bray M, Fuller D, Roberts T, Custer D, Spik K, et al. DNA vaccines expressing either the GP and NP genes of Ebola virus protect mice from lethal challenge. *Virology.* 1998;246:134-44.
  34. Martin JE, Sullivan NJ, Enama ME, Gordon JJ, Roederer M, Kroup RA, et al. A DNA vaccine for Ebola virus is safe and immunogenic in a phase I clinical trial. *Clin Vaccine Immunol.* 2006;13:1267-77.
  35. Sarwar UN, Costner P, Enama ME, Berkowitz N, Hu Z, Hendel CS, et al. Safety and immunogenicity of DNA vaccines encoding Ebolavirus and Marburgvirus wild-type glycoproteins in a phase I clinical trials. *J Infect Dis.* 2014;211:549-57, /infdis/jiu-L.
  36. Kibuuka H, Berkowitz NM, Millard M, Enama ME, Tindikahwa A, Sekiziyivu AB, et al. Safety and immunogenicity of Ebola virus and Marburg virus glycoprotein DNA vaccines assessed separately and concomitantly in healthy Ugandan adults: A phase 1b, randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Lancet.* 2014;385:1545-54.
  37. Mellquist-Riemschneider JL, Garrison AR, Geisbert JB, Saikh KU, Heidebrink KD, Jahrling PB, et al. Comparison of the protective efficacy of DNA and baculovirus-derived protein vaccines for Ebola virus in guinea pigs. *Virus Res.* 2003;92:187-93.
  38. Warfield KL, Bosio CM, Welcher BC, Deal EM, Mohamadzadeh M, Schmaljohn A, et al. Ebola virus-like particles protect from lethal Ebola virus infection. *PNAS.* 2003;100:15889-94.
  39. Warfield KL, Swenson DL, Olinger GG, Kalina WV, Aman MJ, Bavari S. Ebola virus-like particle-based vaccine protects nonhuman primates against lethal Ebola virus challenge. *J Infect Dis.* 2007;196 Suppl 2:S430-7.
  40. Halfmann P, Kim JH, Ebihara H, Noda T, Neumann G, Feldman H, et al. Generation of biologically contained Ebola viruses. *PNAS.* 2008;105:1129-33.
  41. Sun Y, Carrion R, Ye L, Wen Z, Ro YT, Brasky K, et al. Protection against lethal challenge by Ebola virus-like particles produced in insect cells. *Virology.* 2009;383:12-21.
  42. Halfmann P, Ebihara H, Marzi A, Hatta Y, Waranabe S, Suresh M, et al. Replication-deficient Ebolavirus as a vaccine candidate. *J Virol.* 2009;83:3810-5.
  43. Bukreyev A, Yang L, Zaki SR, Shieh WJ, Rollin PE, Murphy BR, et al. A single intranasal inoculation with a paramyxovirus-vectorized vaccine protects guinea pigs against a lethal-dose Ebola virus challenge. *J Virol.* 2006;80:2267-79.
  44. Bukreyev A, Marzi A, Feldmann F, Zhang L, Yang L, Ward JM, et al. Chimeric human parainfluenza virus bearing the Ebola virus glycoprotein as the sole surface protein is immunogenic and highly protective against Ebola virus challenge. *Virology.* 2009;383:348-61.
  45. Bukreyev A, Dinapoli JM, Yang L, Murphy BR, Collins PL. Mucosal parainfluenza virus-vectorized vaccine against Ebola virus replicates in the respiratory tract of vector-immune monkeys and is immunogenic. *Virology.* 2010;399:290-8.
  46. Blaney JE, Wirblich C, Papaneri AB, Johnson RF, Myers CJ, Juelich TL, et al. Inactivated or live-attenuated bivalent vaccines that confer protection against rabies and Ebola viruses. *J Virol.* 2011;85:10605-16.
  47. Papaneri AM, Wirblich C, Cooper K, Jahrling PB, Schnell MJ, Blaney JE. Further characterization of the immune response in mice to inactivated and live rabies vaccines expressing Ebola virus glycoprotein. *Vaccine.* 2012;30:6136-41.
  48. Tsuda Y, Caposio P, Parkins CJ, Botto S, Messaoudi I, Cicin-Sain L, et al. A replicating cytomegalovirus-based vaccine encoding a single Ebola virus nucleoprotein CTL epitope confers protection against Ebola virus. *PLoS Trop Med.* 2011;5:e1275.
  49. Kobinger GP, Feldmann H, Zhi Y, Schumer G, Gao G, Feldmann F, et al. Chimpanzee adenovirus vaccine protects against Zaire Ebola virus. *Virology.* 2006;346:394-401.
  50. Sullivan NJ, Geisbert TW, Geisbert JB, Shedlock DJ, Xu L, Lamoreaux L, et al. Immune protection of nonhuman primates against Ebola virus with a single low-dose adenovirus vectors encoding modified GPs. *PLoS Medicine.* 2006;3:e177.
  51. Richardson JS, Yao MK, Tran KN, Croyle MA, Strong JE, Feldmann H, et al. Enhanced protection against Ebola virus mediated by an improved adenovirus-based vaccine. *PLoS One.* 2009;4:e5308.
  52. Pratt WD, Wang D, Nichols DK, Luo M, Woraratanadham J, Dye JM, et al. Protection of nonhuman primates against two species of Ebola virus infection with a single complex adenovirus vector. *Clin Vaccine Immunol.* 2010;17:572-81.
  53. Ledgerwood JE, Costner P, Desai N, Holman L, Enama ME, Yamschchikov G, et al. A replication defective recombinant Ad5 vaccine expressing Ebola virus GP is safe and immunogenic in healthy adults. *Vaccine.* 2010;29:304-13.
  54. Mast TC, Kierstead L, Gupta SB, Nikas AA, Kallas EG, Novitsky V, et al. International epidemiology of human pre-existing adenovirus (Ad) type 5, type-6, type-26 and type-36 neutralizing antibodies: Correlates of high Ad5 titers and implications for potential HIV vaccine trials. *Vaccine.* 2010;28:950-7.
  55. Richardson JS, Abou MC, Tran KN, Kumar A, Sahai BM, Kobinger GP. Impact of systemic or mucosal immunity to adenovirus on Ad-based Ebola virus vaccine efficacy in guinea pigs. *J Infect Dis.* 2011;204 Suppl 3:S1032-42.
  56. Choi JH, Schafer SC, Zhang L, Juelich T, Freiberg AN, Croyle MA. Modeling pre-existing immunity to adenovirus in rodents: Immunological requirements for successful development of a recombinant adenovirus serotype 5-based Ebola vaccine. *Mol Pharm.* 2013;10:3342-55.
  57. Geisbert TW, Bailey M, Hensley L, Asiedu C, Geisbert J, Stanley D, et al. Recombinant adenovirus serotype 26 (Ad26) and Ad35 vaccine vectors bypass immunity to Ad5 and protect nonhuman primates against Ebolavirus challenge. *J Virol.* 2011;85:4222-33.

58. Stanley DA, Honko AN, Asiedu C, Trefry JC, Lau-Kilby AW, Johnson JC, et al. Chimpanzee adenovirus vaccine generates acute and durable protective immunity against Ebolavirus challenge. *Nat Med.* 2014;20:1126-9.
59. Choi JH, Schafer SC, Zhang L, Kobinger GP, Juelich T, Freiberg AN, et al. A single sublingual dose of an adenovirus-based vaccine protects against lethal Ebola challenge in mice and guinea pigs. *Mol Pharma.* 2012;9:156-67.
60. Choi JH, Jonsson-Schmunk K, Qiu X, Shedlock DJ, Strong J, Xu JX, et al. A single dose respiratory recombinant adenovirus-based vaccine provides long-term protection for non-human primates from lethal Ebola infection. *Mol Pharm.* 2014, dx.doi.org/10.1021/mp500646d.
61. Ledgerwood JE, DeZure AD, Stanley DA, Novik L, Enama ME, Berkowitz NM, et al. Chimpanzee Adenovirus vector Ebola vaccine — Preliminary report. *N Engl J Med.* 2014, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1410863>.
62. Plotkin SA. Correlates of protection induced by vaccination. *Clin Vaccine Immunol.* 2010;17:1055-65.
63. Marzi A, Feldmann H, Geisbert TW, Falzarano D. Vesicular stomatitis virus-based vaccines for prophylaxis and treatment of filovirus infections. *J Bioterror Biodef.* 2011;S1(4), 2157-2526-S1-004.
64. Geisbert TW, Feldmann H. Recombinant vesicular stomatitis virus-based vaccines against Ebola and Marburg virus infections. *J Infect Dis.* 2011;204:S1075-81.
65. Jones SM, Stroher U, Fernando L, Qiu X, Alimonti J, Melito P, et al. Assessment of a vesicular stomatitis virus-based vaccine by use of the mouse model of Ebola virus hemorrhagic fever. *J Infect Dis.* 2007;196 Suppl 2:S404-12.
66. Marzi A, Ebihara H, Callison J, Groseth A, Williams KJ, Geisbert W, et al. Vesicular stomatitis virus-based Ebola vaccines with improved cross-protective efficacy. *J Infect Dis.* 2011;204:S1066-74.
67. Fenimore PW, Muhammad MA, Fischer WM, Foley BT, Bakken RR, Thirmond JR, et al. Designing and testing broadly-protective filoviral vaccines optimized for cytotoxic T-lymphocyte epitope coverage. *PloS ONE.* 2012;10:e44769.
68. Qiu X, Fernando L, Alimonti JB, Melito PL, Feldmann F, Dick D, et al. Mucosal immunization of cynomolgus macaques with the VSV $\Delta$ G/ZEBOVGP vaccine stimulates strong Ebola GP-specific immune responses. *PloS One.* 2009;4:e5547.
69. Wong G, Audet J, Fernando L, Fausther-Bovendo H, Alimonti JB, Kobinger GP, et al. Immunization with vesicular stomatitis virus vaccine expressing the Ebola glycoprotein provides sustained long-term protection in rodents. *Vaccine.* 2014;32:5722-9.
70. Wang Y, Liu Z, Dai Q. A highly immunogenic fragment derived from Zaire Ebola virus glycoprotein elicits effective neutralizing antibody. *Virus Res.* 2014;189:254-61.
71. Geisbert TW, Daddario-DiCaprio KM, Williams KJ, Geisbert JB, Leung A, Feldmann F, et al. Recombinant vesicular stomatitis virus vector mediates postexposure protection against Sudan Ebola hemorrhagic fever in nonhuman primates. *J Virol.* 2008;16:1119-22.
72. Tsuda Y, Safronetz D, Brown K, LaCasse R, Marzi A, Ebihara H, et al. Protective efficacy of a bivalent recombinant vesicular stomatitis virus vaccine in the Syrian hamster model of lethal Ebola virus infection. *J Infect Dis.* 2011;204 Suppl 3:S1090-7.
73. Falzarano D, Feldmann F, Grolla A, Leung A, Ebihara H, Strong JE, et al. Single immunization with a monovalent vesicular stomatitis virus-based vaccine protects nonhuman primates against heterologous challenge with Bundibugyo Ebolavirus. *J Infect Dis.* 2011;204:S1082-9.
74. Feldmann H, Jones SM, Daddario-DiCaprio KM, Geisbert JB, Stroher U, Grolla A, et al. Effective post-exposure treatment of Ebola infection. *PloS Pathog.* 2007;3:e2.
75. Geisbert TW, Daddario-DiCaprio KM, Lewis MG, Geisbert JB, Grolla A, Leung A, et al. Vesicular stomatitis virus-based Ebola vaccine is well-tolerated and protects immunocompromised nonhuman primates. *PLoS Pathog.* 2008;4:e1000025.
76. Lee BY, Moss WJ, Privor-Dumm L, Constenla DO, Knoll MD, O'Brien KL. Is the world ready for an Ebola vaccine? *Lancet.* 2015;385:203-4.
77. Mohammadi D. Ebola vaccine trials back on track. *Lancet.* 2015;385:214-5.