

COMPOSICIONES VACUNALES CONTRA EL VIRUS SARS-CoV-2 BASADAS EN UN DÍMERO DEL DOMINIO DE UNIÓN AL RECEPTOR Y LA VESÍCULA DE MEMBRANA EXTERNA DEL MENINGOCOCO B

5 CAMPO DE LA TÉCNICA

La presente invención se relaciona con el campo de la biotecnología, específicamente con las vacunas para la prevención de la COVID-19. Particularmente, describe nuevas composiciones vacunales para prevenir la infección con el virus SARS-CoV-2. Dichas composiciones comprenden el dominio de unión al receptor del virus SARS-CoV-2 expresado en forma de dímero estable como antígeno relevante y adicionalmente vesículas derivadas de proteínas de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* grupo B y un adyuvante, capaces de inducir altos títulos de anticuerpos y respuesta celular contra el virus SARS-CoV-2.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

La enfermedad COVID19 es de muy reciente aparición, en Wuhan, China en diciembre de 2019, cuando se reportaban casos graves de neumonías de etiología desconocida. La enfermedad causada por el virus SARS-CoV-2 se caracteriza por una rápida difusión entre personas, principalmente con la aparición de síntomas como fiebre, tos, rinorrea, dolor de garganta y dificultad para respirar, en los casos sintomáticos, que representan menos del 50 %.

En el resto de las personas la enfermedad cursa de forma asintomática, siendo este un elemento importante en la diseminación de la enfermedad y un reto epidemiológico para su control(WHO Coronavirus disease (COVID-2019) situation reports. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports>. Consultado el 13 de agosto de 2020).

Coronavirus similares al SARS-CoV-2, conocidos como MERS y el SARS, han constituido agentes causantes de epidemias similares en décadas anteriores. El SARS tiene mayor homología con el SARS-CoV-2, y uno de los elementos de similitud es que ambos virus utilizan la proteína ACE2 como receptor para penetrar en las células humanas. Por tanto, en el SARS como en el SARS-CoV-2, la interacción entre el dominio de unión al receptor (RBD, del inglés *receptor binding domain*) de la proteína viral S1 y la proteína ACE2 (del inglés *angiotensin-converting enzyme 2*) es decisiva para la infección con el virus en el ser humano. (Walls A y cols.(2020) Cell <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>). Este dominio RBD de la proteína S del virus SRA-CoV2 es un fragmento de aproximadamente 223 aminoácidos, que constituye la región por la cual el virus interacciona con el receptor ACE2.

- La presencia de anticuerpos anti-RBD correlacionan con actividad neutralización en el suero de convalecientes de COVID-19 (Dai L. y cols (2020) Cell <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.035>; Quinlan B.D. y cols (2020) <https://doi.org/10.1101/2020.04.10.036418>; Zang J. y cols (2020) <https://doi.org/10.1101/2020.05.21.107565> y <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04466085?term=NCT04466085&draw=2&rank=1> consultado el 17 de agosto 2020). Por tanto, estrategias vacunales que busquen inducir anticuerpos contra el anti-RBD tiene altas probabilidades de inducir anticuerpos neutralizantes contra el virus.
- 10 Una estrategia validada para el SARS que se está empleando en el SARS-CoV-2 consiste en utilizar el RBD como antígeno específico en vacunas, combinado simplemente con alúmina u otros adyuvantes conocidos. El objetivo está en lograr una elevada respuesta de anticuerpos específicos contra el RBD que tengan la capacidad de proteger de la entrada del virus a la célula.
- 15 Hasta el presente (10 de agosto de 2020) se encuentran en evaluación preclínica 139 candidatos vacunales contra el SARS-CoV-2 y 28 en fase de ensayos clínicos. De ellos, al menos ocho candidatos (2 en fase clínica), utilizan el RBD como antígeno específico. Adicionalmente, tres candidatos en fase preclínica, utilizan alguna vesícula de membrana externa como plataforma vacunal (DRAFT landscape of COVID-19 candidate vaccines –10 August 2020 <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines> consultado el 10 de agosto 2020).
- El monómero del RBD también se ha utilizado absorbido en alúmina en animales demostrando su inducción de anticuerpos neutralizantes sin incremento de la enfermedad provocada por anticuerpos (Quinlan B.D. y cols (2020) <https://doi.org/10.1101/2020.04.10.036418>; Zang J. y cols (2020) <https://doi.org/10.1101/2020.05.21.107565>). El RBD ha sido también producido en otros hospederos y aunque la glicosilación en las asparaginas en 331 y 343 depende mucho de la plataforma de expresión de cada hospedero (Chen WH y cols (2017) Journal of Pharmaceutical Sciences 106: 1961-1970). En humanos, se ha promovido como vacunas contra el SARS-CoV el RBD absorbido en alúmina en concentraciones elevadas de hasta 50 microgramos (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04466085?term=NCT04466085&draw=2&rank=1> consultado el 17 de agosto 2020). Otras formulaciones evalúan la proteína RBD comprendiendo los residuos aminoácidos del 319-545 expresada y purificada en células de insectos y baculovirus, en ningún momento refiere la obtención de un dímero (Yang J y cols (2020) Nature <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2599-8>).

La solución técnica que más se acerca a la presente invención es el reporte de una formulación vacunal contra COVID-19 que emplea un dímero de RBD expresado en tándem en células CHO y adyuvado, desarrollado por el Instituto de Microbiología de la Academia de Ciencias Chinas con la empresa Anhui Zhifei Longcom Biopharmaceuticos que resultó fuertemente inmunogénico con títulos de anticuerpos específicos del orden de 10^5 (Dai L. y cols (2020) Cell <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.035>). Este candidato se encuentra en fase ensayos clínicos. El dímero de esta solución técnica se obtiene a partir del clonaje de la secuencia que codifica para el dímero, a diferencia del dímero de la presente invención, que se concibe por diseño una secuencia de aminoácidos que garantiza la dimerización de la unidad monomérica de RBD.

Otros candidatos vacunales que se encuentran en ensayos preclínicos purifican vesículas modificadas genéticamente que transportan fragmentos virales. Este es el caso de Quadram Institute Bioscience y BiOMViS Sr (<https://quadram.ac.uk/quadram-researchers-working-on-covid-19-vaccine-join-who-expert-groups/> Consultado el 17 de agosto de 2020). Otras compañías como Intravacc combinan las propiedades inmunogénicas de las VME con la proteína S del SARS-CoV-2 (<https://www.hospimedica.com/epivax-and-intravacc-to-jointly-develop-covid-19-vaccine-based-on-novel-click-on-omv-technology/articles/294782783/epivax-and-intravacc-to-jointly-develop-covid-19-vaccine-based-on-novel-click-on-omv-technology.html> Consultado el 17 de agosto de 2020).

Los inventores de la presente invención al combinar las vesículas de membrana externa (VME) del meningococo B, con el RBD en forma de dímero estable; inesperadamente encontraron una superioridad respecto a las composiciones vacunales ya reportadas que utilizan el RBD, en cuanto a prontitud e intensidad de la respuesta, afinidad de los anticuerpos obtenidos y capacidad neutralizante del virus, respuesta celular tipo Th1, características fundamentales que son muy importantes en la situación de pandemia causada por el SRS-CoV2. Con las composiciones vacunales descritas en la presente invención se logra una respuesta de anticuerpos IgG anti-RBD a los 7 días de inmunización con una polarización de la respuesta celular hacia un patrón Th1, caracterizado por la inducción de IFN γ e isotipo IgG2a, por lo que no se esperan los efectos inmunopatológicos reportados para vacunas contra coronavirus que inducen un patrón Th2.

Es procedente establecer respecto a la presente invención que ninguna solución técnica anterior o publicación científica describe composiciones vacunales basadas en la combinación del dímero-RBD con vesículas de membrana externa de meningococo B, que tienen la sorprendente propiedad de que la potenciación de la respuesta inmune inducida contra el RBD es superior a la inducida por composiciones vacunales que no contienen dichas vesículas. Por tanto, la novedad de esta invención consiste en proporcionar nuevas

composiciones vacunales contra COVID-19 que inducen una potente respuesta inmune contra el virus.

Breve descripción de la invención

- 5 En una realización la presente invención se relaciona con composiciones vacunales para inducir una respuesta inmune protectora contra el virus SARS-CoV-2 que se caracterizan porque comprenden como antígeno un dímero del dominio de unión al receptor (RBD) de la proteína S del SARS-CoV-2 y vesículas de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* grupo B como vehículo inmunopotenciador. Particularmente, el antígeno RBD se diseñó con
- 10 la secuencia aminoacídica 319-541 que se muestra en la SEQ ID NO 1 garantizando una cisteína libre en la posición 538 que favoreciera la formación de la estructura dimérica del RBD. Dichas composiciones vacunales adicionalmente comprenden un adyuvante que se selecciona del grupo que comprende cualquier sal mineral como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y fosfato cálcico sin limitarse a estos.
- 15 Una realización adicional comprende un procedimiento para la obtención de las VME de la que comprende las siguientes etapas solubilizar las VME en agua de calidad farmacéutica por agitación y sonicar las VME a una temperatura menor de 10°C.
- En otra realización la presente invención se relaciona con el uso de las composiciones vacunales antes descritas en la prevención de la infección por el virus SARS-CoV-2. En particular, con el uso de las composiciones vacunales aquí descritas en la inducción de una
- 20 respuesta temprana de anticuerpos IgG contra el virus SARS-CoV-2 en un esquema de inmunización por vía intramuscular que comprende preferentemente un rango de dosis entre 5-50 µg de RBD, entre 10-100 µg de VME y entre 0.5-2.0 mg/mL de hidróxido de aluminio, en un rango de 1 a 3 inmunizaciones, preferentemente 2 inmunizaciones.
- 25 En otra realización particular, la presente invención se relaciona con el uso de las composiciones vacunales aquí descritas en la inducción de una respuesta celular contra el virus SARS-CoV-2 caracterizada por la polarización a un patrón Th1, en un esquema de inmunización por vía intramuscular que comprende preferentemente 2 dosis que contienen entre 5-50 µg de RBD, entre 10-100 µg de VME y entre 0.5-2.0 mg/mL de hidróxido
- 30 de aluminio, en un rango de 1 a 3 inmunizaciones, preferentemente 2 inmunizaciones.

Descripción detallada de la invención**Método de obtención del antígeno**

Las secuencias de codificación para la proteína RBD se sintetiza y subclona en el vector de expresión pcDNA3.1. La secuencia aminoacídica seleccionada del RBD es la
5 correspondiente a los aminoácidos del 319 al 541. La construcción que contiene la proteína objetivo se transfecta en células CHO.

La proteína objetivo se cosecha por centrifugación y filtración, luego se carga en una columna de afinidad de Ni-Sepharose, seguido por purificación por Superdex 200. La proteína purificada se analiza mediante métodos apropiados que incluyen la determinación de talla
10 molecular, pureza, identidad, secuencia de aminoácidos, que pueden ser SDS-PAGE, SEC-HPLC, MS.

Durante la purificación del RBD y en presencia de aire (condiciones oxidantes suaves), el RBD se dimeriza mediante la formación de un puente disulfuro entre las dos cisteínas libres que se encuentran en la posición 538 de ambas moléculas. Este puente bisulfuro
15 intermolecular es suficientemente estable y solo se rompe en condiciones reductoras.

La extracción y purificación de las VME de *Neisseria meningitidis* se realiza según (CU21888A1).

Composiciones vacunales:

20 Esta formulación es una suspensión inyectable que contiene un dímero del RBD mezclado con vesículas de membrana externas de meningococo B y un adyuvante.

La presente invención se refiere a una vacuna que contiene como antígeno relevante el dominio de unión al receptor de la proteína S de SARS-CoV-2 expresado en forma de dímero estable, por diseño de la secuencia aminoacídica seleccionada 319-541 contiene 9
25 aminoácidos cisteínas, 8 de los cuales forman 4 puentes bisulfuros intramoleculares que garantizan la estructura estable del dominio. La cisteína 538 que usualmente está en la proteína nativa formando un puente bisulfuro intramolecular, en virtud de la secuencia truncada seleccionada, queda libre, permitiendo la formación de un puente bisulfuro intermolecular entre dos C 538 libres, lo que estabiliza la estructura formando un dímero que
30 es más inmunogénico que el correspondiente monómero.

Un componente esencial para obtener el efecto de la presente invención es la vesícula de membrana externa (VME) del meningococo con un tamaño entre 150-300 nanómetros. Las VME tienden a formar agregados en solución y esto genera preparaciones con poblaciones con un amplio rango de tamaño de partículas. El tratamiento de las VME para reducir el grado

de agregación es un proceso de vital importancia para obtener preparados inmunogénicos y reproducibles (WO 2006/008504 A1). La presente invención provee preparaciones de VME, que son estables por al menos 10 días en temperaturas hasta 10 °C, preferentemente entre 2 y 8°C, con tamaño de partículas de hasta 500 nm, preferentemente entre 100-300 nm, preferentemente en el rango entre 150-300 nm y el procedimiento para su obtención. El método para estabilizar las VME en la presente invención parte de VME precipitadas en etanol al 70% que se someten a un proceso de solubilización en agua de calidad farmacéutica por agitación a menos de 500 rpm, preferiblemente entre 100 y 300 rpm al menos 3 horas, preferiblemente entre 1-2 horas, a temperatura ambiente entre 18-25 °C. El proceso continúa con un paso de desagregación mediante sonicación en baño ultrasónico a una frecuencia de entre 20-40 kHz, a temperatura menor de 10°C, preferentemente entre 2-8°C durante un rango de entre 30 minutos a 4 horas, preferentemente entre 1-3 horas. Para medir la desagregación de las VME se emplea la técnica de Dispersión de Luz Dinámica (DLS) para la determinación del tamaño promedio y la distribución de tamaños de partículas en la preparación.

Los dos componentes, el RBD de la proteína S de SARS-CoV-2 expresado en forma de dímero estable y la VME se mezclan por agitación por al menos 30 minutos, preferentemente entre 10-20 minutos a temperatura ambiente entre 18-25 °C. La mezcla RBD-VME se adsorbe en gel de hidróxido de aluminio entre 70-100% por agitación a menos de 500 rpm, preferiblemente entre 100 y 300 rpm entre 30 minutos a 1 hora. Las composiciones vacunales comprenden excipientes farmacéuticamente adecuados que pueden regular el pH entre ellos tampones fosfatos en rango de concentraciones entre 0.5-1.0 mM, soluciones isotónicas como por ejemplo el cloruro de sodio en rango de concentraciones entre 50-150 mM, sin limitarse a estos y preservantes como tiomersal sin limitarse a este. Las composiciones vacunales objeto de la presente invención demuestran superioridad respecto a lo reportado en el estado del arte para el antígeno del Dominio de Unión al Receptor de la proteína S de SARS-CoV-2 en 3 características que son muy importantes en la situación de pandemia: prontitud e intensidad de la respuesta, afinidad de los anticuerpos, capacidad neutralizante del virus y respuesta celular tipo Th1.

30

Métodos de administración

Las composiciones vacunales contra el virus SARS-COV-2 basadas en un dímero del dominio de unión al receptor y la vesícula de membrana externa del meningococo B se administra por vía intramuscular o subcutánea, en dosis de RBD entre 5-50 µg, preferentemente entre 10-20µg; dosis de VME entre 20-50 µg, en esquema de tratamiento de dos dosis a intervalos de 21-28 días. Las composiciones vacunales pueden contener

35

cualquier sal mineral como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y fosfato cálcico sin limitarse a estos, en dosis entre 500-2500 μg , preferentemente entre 500-1000 μg .

Estas formulaciones se administran a los sujetos en esquema de 1-3 dosis, preferentemente dos dosis, a intervalos entre 21-28 días.

5

Descripción de las figuras

Figura 1. Componentes de las formulaciones vacunales. A: Secuencia aminoacídica del RBD 319-541. B: Tamaño de partícula determinado por DLS de las VME desagregadas y C: Títulos de anticuerpos IgG anti-RBD inducidos en ratones BALB/c, después de la inmunización con lotes producidos en condiciones de buenas prácticas de fabricación (GMP) de RBD formulado en VME/ $\text{Al}(\text{OH})_3$.

Figura 2. Títulos de anticuerpos IgG anti-RBD inducidos a los siete días después de la inmunización con RBD-dímero formulado en VME/ $\text{Al}(\text{OH})_3$ y en $\text{Al}(\text{OH})_3$. Letras diferentes representan diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Figura 3. Títulos de anticuerpos IgG anti-RBD a los siete días después de la inmunización con RBD-dímero formulado en VME/ $\text{Al}(\text{OH})_3$ comparado con el RBD-monómero formulado en VME/ $\text{Al}(\text{OH})_3$. Letras diferentes representan diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Figura 4. Cinética de anticuerpos IgG anti-RBD inducidos por diferentes composiciones vacunales de RBD-dímero formulado en VME/ $\text{Al}(\text{OH})_3$ comparado con RBD dímero formulado en $\text{Al}(\text{OH})_3$. Letras diferentes representan diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Figura 5. Índice de avidéz de los anticuerpos anti-RBD inducidos por el RBD-dímero formulado en VME/ $\text{Al}(\text{OH})_3$ comparado con RBD-dímero formulado en $\text{Al}(\text{OH})_3$.

Figura 6. A) Inhibición de la interacción RBD-ACE2 por los anticuerpos inducidos en ratones BALB/c, después de la inmunización con RBD formulado en VME/ $\text{Al}(\text{OH})_3$. B) Actividad neutralizante contra el virus SARS-CoV-2 de los sueros de ratones inmunizados con dos dosis RBDd/VME/ $\text{Al}(\text{OH})_3$ y comparado con RBDd formulado en $\text{Al}(\text{OH})_3$. Los asteriscos denotan diferencias significativas ($p < 0,05$).

Figura 7. A) Inducción de la producción de IFN γ e IL-4 por células del bazo de ratones inmunizados con RBD dímero en VME/ $\text{Al}(\text{OH})_3$, re-estimados *in vitro* con RBD, determinado por ELISA cuantitativo. Los datos se muestran como pg/mL. Letras diferentes denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) según prueba Tukey. B) Balance isotipos IgG2a/IgG1 como indicativo de inducción de patrón Th1.

Ejemplos de realización

Ejemplo 1. Formulación de las composiciones vacunales contra el SARS-CoV-2.

Se obtuvieron dos formulaciones a partir del RBD en su forma dimérica con la secuencia que se muestra en la Figura 1A con concentraciones de 10 y 20 µg como antígeno vacunal, VME
5 desagregadas en tallas entre 150-300 nm con concentraciones entre 20 y 40 µg y el hidróxido de aluminio con adyuvante a una concentración de 500 µg.

Las VME se extraen y precipitan en etanol mediante la metodología descrita en CU21888A1. A partir de las VME precipitadas se pesa la masa necesaria y se resuspende en agua para inyección, se homogeniza hasta total disolución (aproximadamente 1 hora) con agitación
10 moderada y a temperatura ambiente. Una vez disuelta la VME, se verifica la no presencia de grumos, ni turbidez y se procede a desagregar en baño ultrasónico manteniendo la temperatura $\leq 10^{\circ}\text{C}$ durante el tiempo de sonicación. Transcurrido el tiempo de desagregación se toma muestras para realizar determinación del tamaño de partícula por Dispersión de Luz Dinámica (DLS)(Figura 1 B). Como control de este proceso las VME deben
15 presentar tallas entre 150-300 nm. Las VME desagregadas se conservan a temperatura entre $(2 - 8)^{\circ}\text{C}$.

La mezcla de la VME desagregada con el RBD(VME-RBD) se homogeniza con agitación moderada (100-300 rpm) y durante 15 minutos.

Finalmente, todo el contenido de la mezcla VME-RBD se adiciona sobre el hidróxido de aluminio, se añaden por filtración los componentes de la formulación manteniendo los
20 parámetros ajustados anteriormente entre 30 minutos y 1 hora. La formulación se conserva a una temperatura entre $(2 - 8)^{\circ}\text{C}$.

Las formulaciones producidas en condiciones de buenas prácticas de fabricación (del inglés *Good manufacturing process* GMP) de RBD formulado en VME/ $\text{Al}(\text{OH})_3$ (Figura 1C) inducen
25 respuesta de anticuerpos IgG anti-RBD en ratones BALB/c, superior a los grupos sin el antígeno vacunal.

Ejemplo 2. La formulación con RBD dímero en VME/ $\text{Al}(\text{OH})_3$ induce una respuesta temprana de anticuerpos en ratones BALB/c, a diferencia del RBD dímero en $\text{Al}(\text{OH})_3$.

30 Ratones BALB/c se inmuniza por vía intramuscular a tiempo 0, en un volumen de administración de 0,1 mL con una de las siguientes formulaciones:

- Grupo 1: 10 µg de RBD-dímero mezclada con 20 µg de VME desagregada y co-adsorbida en 800 µg de Al(OH)₃;
- Grupo 2: 10 µg de RBD-dímero co-adsorbido en 800 µg de Al(OH)₃;
- Grupo 3: 20 µg de VME desagregada y adsorbida en 800 µg de Al(OH)₃ y
- 5 - Grupo 4: 800 µg de Al(OH)₃.

Los grupos 3 y 4 constituyen las formulaciones controles negativos.

Se realiza la extracción de sangre a tiempo 0 y 7 días después de la inmunización. El suero de los animales inmunizados se analiza mediante un ELISA indirecto para determinar el título de anticuerpos anti-RBD. Las placas de microtitulación de 96 pocillos NUNC Maxisorp se
10 recubrieron con 50 µL de RBD a una concentración de 3 µg/mL en disolución reguladora carbonato-bicarbonato pH 9.6, se incubaron 1 hora a 37°C y al término se lavaron tres veces con disolución de lavado. Posteriormente, se bloquearon los sitios no recubiertos empleando 100 µL de una disolución de bloqueo de leche descremada al 5% durante 1 hora a 37°C. Luego de otro paso de lavado como se describió previamente, se adicionaron los sueros
15 disueltos en disolución reguladora de fosfatos pH 7.2 + BSA al 1% en diluciones seriadas (1:3), generalmente partiendo de 1/50 y en un volumen de 50 µL/pozo. Las placas se incubaron 1 hora a 37°C y fueron lavadas nuevamente. A continuación, se adicionaron 50 µL de una dilución de anti-inmunoglobulina G de ratón conjugada a peroxidasa en disolución reguladora de fosfatos pH 7.2 + BSA al 1% (1:5000) y se incubaron durante 1 hora. Luego de
20 un último paso de lavado, se aplicó 50 µL/pozo de la disolución sustrato para enzima peroxidasa. Se incubó en la oscuridad durante 20 minutos y se detuvo la reacción con disolución de H₂SO₄ 2N 50 µL/pozo. Se leyó la absorbancia a 450 nm en un lector de ELISA Multiskan EX (ThermoScientific). El Título de IgG se definió como el inverso de la dilución del suero de cada animal individual donde se alcanza cuatro veces el valor de la media de la absorbancia de los sueros pre-inmunes (T₀) diluido 1/50. Para una mejor presentación y
25 análisis de los resultados se calcula el Log₁₀ del Título de cada animal individual. Para definir los animales respondedores, se consideró como valor de corte un Log del Título > 1.70, lo que se corresponde con una dilución del suero superior a 1/50. Los animales cuyo Título fue inferior al límite de detección del ensayo, se consideró un valor de Título igual a 25 y de log₁₀
30 de 1.4.

La figura 2 muestra la respuesta temprana de anticuerpos IgG inducida por la inmunización de formulaciones del Grupo 1 que contiene RBD-dímero en VME/Al(OH)₃ y Grupo 2 que contiene RBD-dímero en Al(OH)₃. Se aprecia que 7 días después la inmunización, se induce una respuesta de anticuerpos anti-RBD significativamente mayor ($p \leq 0,05$, *One-way* ANOVA
35 ordinario y el test de comparaciones múltiples de Tukey) en el 90% (9 de 10) de los ratones inmunizados con la formulación que contiene RBD-dímero en VME/Al(OH)₃, comparado con

la que contiene RBD-dímero en $\text{Al}(\text{OH})_3$. Esta propiedad es atribuible a la capacidad inmunopotenciadora de la VME presente en la formulación.

Ejemplo 3. La formulación con RBD dímero en $\text{VME}/\text{Al}(\text{OH})_3$ induce una respuesta temprana de anticuerpos en ratones BALB/c, a diferencia del RBD monómero en $\text{VME}/\text{Al}(\text{OH})_3$.

Ratones BALB/c se inmunizan por vía intramuscular a tiempo 0, en un volumen de administración de 0,1 mL con una de las siguientes formulaciones:

- Grupo 1: 10 μg de RBD-dímero mezclado con 20 μg de VME desagregada y co-adsorbida en 800 μg de $\text{Al}(\text{OH})_3$;
- Grupo 2: 10 μg de RBD-dímero co-adsorbido en 800 μg de $\text{Al}(\text{OH})_3$;
- Grupo 3: 10 μg de RBD-monómero mezclado con 20 μg de VME desagregada y co-adsorbida en 800 μg de $\text{Al}(\text{OH})_3$;
- Grupo 4: 10 μg de RBD-monómero adsorbido en 800 μg de $\text{Al}(\text{OH})_3$;
- Grupo 5: 20 μg de VME desagregada y adsorbida en 800 μg de $\text{Al}(\text{OH})_3$ y
- Grupo 6: 800 μg de $\text{Al}(\text{OH})_3$.

Los grupos 5 y 6 constituyen las formulaciones controles negativos.

La extracción de sangre para la obtención del suero y la metodología de evaluación empleada coincide con el descrito en el ejemplo 2.

- La figura 3 muestra la respuesta temprana de anticuerpos IgG inducida por la inmunización de formulaciones que contienen RBD-dímero en $\text{VME}/\text{Al}(\text{OH})_3$ comparado con el RBD-monómero en la misma formulación. Se aprecia que 7 días después la inmunización, se induce una respuesta de anticuerpos anti-RBD significativamente mayor ($p \leq 0,05$, *One-way ANOVA* ordinario y el test de comparaciones múltiples de Tukey) en el grupo de ratones inmunizados con la formulación del grupo 1 que contiene RBD-dímero en $\text{VME}/\text{Al}(\text{OH})_3$, comparado con la del grupo 3 que contiene RBD-monómero en la misma formulación de $\text{VME}/\text{Al}(\text{OH})_3$. Esta propiedad es atribuible a la mayor inmunogenicidad del dímero sobre el monómero.

Ejemplo 4. La formulación con RBD dímero en $\text{VME}/\text{Al}(\text{OH})_3$ es altamente inmunogénica en ratones, después de dos dosis.

Ratones BALB/c se inmunizan por vía intramuscular con dos dosis de vacuna a tiempo 0 y 14 días, en un volumen de administración de 0,1 mL con una de las siguientes formulaciones:

- Grupo 1: 3 μg de RBD-dímero mezclado con 20 μg de VME desagregada y co-adsorbido en 800 μg de $\text{Al}(\text{OH})_3$;

- Grupo 2: 10 µg de RBD-dímero mezclado con 20 µg de VME desagregada y co-adsorbido en 800 µg de Al(OH)₃;
- Grupo 3: 3 µg de RBD-dímero adsorbido en 800 µg de Al(OH)₃;
- Grupo 4: 10 µg de RBD-dímero adsorbido en 800 µg de Al(OH)₃;
- 5 - Grupo 5: 20 µg de VME desagregada y adsorbida en 800 µg de Al(OH)₃,
- Grupo 6: 800 µg de Al(OH)₃.

Los grupos 5 y 6 constituyen las formulaciones controles negativos.

La extracción de sangre para la obtención del suero se realiza a tiempo 0, 7, 14, 21 y 28 días, o sea, suero pre-inmune y 7 y 14 días después de cada inmunización. Este esquema tuvo
10 como objetivo comparar las dosis de 3 y 10 µg de dímero-RBD en la formulación con VME/Al(OH)₃ y solo en Al(OH)₃ y evaluar la cinética de anticuerpos inducida por las diferentes formulaciones.

El ELISA para la determinación de anticuerpos anti-RBD se describió en el ejemplo 2.

En la figura 4 se puede apreciar que hay una cinética de anticuerpos anti-RBD de manera
15 dosis dependiente para la formulación del RBD dímero en VME/Al(OH)₃, que se incrementa de manera significativa después de la segunda dosis de vacuna. Sin embargo, no se observan diferencias significativas del RBD dímero formulado en VME/Al(OH)₃ o en Al(OH)₃ después de la segunda dosis de vacuna. Los títulos alcanzados a los 21 y 28 días son
20 significativamente altos para ambas formulaciones, en el orden de 10⁴-10⁶.

Ejemplo 5. Afinidad comparativa de los anticuerpos inducidos por el RBD dímero formulado con VME/Al(OH)₃ comparado con el RBD dímero en Al(OH)₃.

Para la evaluación de la afinidad de los anticuerpos, se determinó el índice de avidez, basado en la disociación de la interacción antígeno-anticuerpo por el tratamiento con un agente
25 caotrópico, el tiocianato de amonio (NH₄SCN). Para ello, se recubrieron con 50 µL de RBD a una concentración de 3 µg/mL en disolución reguladora carbonato-bicarbonato pH 9.6, se incubaron 1 hora a 37°C y al término se lavaron tres veces con disolución de lavado. Posteriormente, se bloquearon los sitios no recubiertos empleando 100 µL de una disolución de bloqueo de leche descremada al 5% durante 1 hora a 37°C y posteriormente se
30 adicionaron los sueros en la dilución cuyo valor de absorbancia fuera aproximadamente 1 en el Elisa de titulación, incubándose a 37°C durante 1 hora. A continuación, se adiciona una concentración fija de NH₄SCN (2 M) durante 15 minutos a temperatura ambiente. El resto del ensayo es similar al descrito en el ejemplo 2

El Índice de Avidez (IA) indica el porcentaje de anticuerpos IgG que permanece unido al
35 antígeno después del tratamiento con el agente caotrópico y se calcula mediante la fórmula (Título de IgG con NH₄SCN/Título de IgG sin NH₄SCN) * 100. Se consideran anticuerpos con

buena avidéz, los que tiene un IA superior al 50 %. El IA solo se determina para los animales respondedores (log del Título > 1.70), determinados por el ELISA de titulación.

- Como se aprecia en la figura 5, los anticuerpos inducidos por el RBD formulado en VME/Al(OH)₃ tienen mayor afinidad ($p \leq 0,05$) que los inducidos por la formulación con alúmina, indicado una mejor calidad de la respuesta inmune inducida por las formulaciones objeto de la presente invención.

Ejemplo 6. Actividad funcional de los anticuerpos anti-RBD inducidos por la formulación RBD-dímero en VME/Al(OH)₃.

10 Inhibición de la interacción de RBD-ACE2 por los anticuerpos inducidos.

Los sueros provenientes de los ratones inmunizados según el procedimiento descrito en el ejemplo 2 extraídos a tiempo 28 se emplearon en un ELISA para determinar su capacidad de inhibición de la interacción del RBD y ACE2.

- Las placas de microtitulación de 96 pocillos se recubrieron con 50 μ L de ACE2-Fc ratón a una concentración de 5 μ g/mL en disolución reguladora carbonato-bicarbonato pH 9.6, se incubaron toda la noche a 4°C y al término se lavaron tres veces con disolución de lavado. Posteriormente, se bloquearon los sitios no recubiertos empleando 200 μ l de una disolución de bloqueo de leche descremada al 2% durante 1 hora a 37°C. A continuación, se preparó el RBD-Fc humano a 40 ng/mL en disolución reguladora de fosfatos pH 7.2 + Leche al 0.2 %.
- Los sueros de ratones inmunizados o pre-inmune, se prepararon a diferentes diluciones, estas abarcaron un rango de 1:25 a 1:400. Se utilizó otra proteína irrelevante como control negativo (PDL1-F humana). Los sueros diluidos se pre-incubaron con RBD-Fc humano en una proporción 1:1, a 37°C durante 1 hora y luego se adicionaron a la placa 50 μ L/pozo de la mezcla y se incubó 1h 30min a 37°C. Luego de un nuevo paso de lavado, se adicionaron 50 μ L de una dilución de anti-IgG humana conjugada a fosfatasa alcalina en disolución reguladora de fosfatos pH 7.2 + Leche al 0.2 % (1:1000) durante 1 hora a 37°C. Luego de un último paso de lavado, se aplicó 50 μ L/pozo de la pNPP (1mg/mL) en tampón dietanolamina. Se incubó en la oscuridad durante 20 minutos y se detuvo la reacción con disolución de NaOH 3M 50 μ L/pozo. Se leyó la absorbancia a 405 nm en un lector de ELISA.
- Se calculó el porciento de inhibición mediante la siguiente fórmula: $(1 - \text{Abs}_{405\text{nm}} \text{ RBD Fc humano} + \text{suero de ratón} / \text{Abs}_{405\text{nm}} \text{ RBD Fc humano}) * 100$.

La figura 6A muestra la capacidad inhibitoria del suero de los ratones inmunizados con la formulación objeto de la presente invención.

35 Capacidad neutralizante de los anticuerpos anti-RBD contra el virus SARS-CoV-2.

La capacidad neutralizante contra el SARS-CoV-2 de los sueros de los ratones inmunizados según el procedimiento descrito en el ejemplo 2 se evaluó mediante un ensayo colorimétrico utilizando Rojo Neutro. Las células Vero E6 se incubaron en medio MEM suplementado con 2 % de suero fetal bovino (SFB), 25 mM/mL de L-glutamina, 2 µg/mL de bicarbonato, 80 µg/mL de gentamicina y 5 µg/mL Anfotericin B. Se eliminó el sobrenadante de la placa y se añadieron 100 µl de solución de sales balanceadas pH 7.2 (PBS) que contenía 0.02% de rojo a cada pozo. Las placas se incubaron una hora a temperatura ambiente y posteriormente se desechó la solución de rojo neutro. La monocapa de células se lavó dos veces con PBS estéril que contenía 0.05% Tween 20. Se adicionaron 100 µL de la solución de lisis (50 parte de etanol absoluto, 49 parte de agua ultrapura y una parte de ácido acético glacial) a cada pozo. La placa se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y se realizó la medición con un espectrofotómetro a 540 nm. Se consideró como título de neutralización, la mayor dilución del suero evaluado con un valor de densidad óptica mayor que el valor de corte. El valor de corte se calculó como el promedio de los valores de la densidad óptica de los pozos del control celular dividido por dos.

La capacidad neutralizante del suero inducido por la formulación RBD dímero en VME/Al(OH)₃ se mostró mediante el ensayo de neutralización viral, demostrándose que se alcanza un título neutralizante de 1:640 como promedio, a los 28 días post-inmunización como se muestra en la figura 6B.

Ejemplo 7. Respuesta inmune celular patrón Th1, determinado por la inducción de IFN γ y balance isotipos IgG2a/IgG1.

La evaluación de la respuesta inmune celular se realizó en los ratones inmunizados según el procedimiento descrito en el ejemplo 2 extraídos a tiempo 28. Los esplenocitos fueron aislados de ratones BALB/c inmunizados con RBD dímero en VME/Al(OH)₃ y RBD dímero en Al(OH)₃, estimulados *in vivo* en presencia de RBD (5 µg/mL). La concentración celular empleada fue de 1 x 10⁶ células/mL. Los niveles de IL-4 e IFN- γ fueron determinados en el sobrenadante de cultivo, mediante ELISA cuantitativo a las 72 horas de estimulación.

La figura 7A demuestra que la inmunización con el RBD dímero en VME/Al(OH)₃ induce niveles superiores de IFN- γ que la formulación del RBD en Al(OH)₃, demostrándose la polarización de la respuesta de células T a un patrón Th1. Adicionalmente, la repuesta de isotipos de IgG demuestra que el balance IgG2a/IgG1 está más favorecido hacia la IgG2a en la formulación en la que el RBD está formulado en VME/Al(OH)₃ respecto a la formulación en Al(OH)₃, demostrando la polarización a respuesta Th1.

COMPOSICIONES VACUNALES CONTRA EL VIRUS SARS-CoV-2 BASADAS EN UN DÍMERO DEL DOMINIO DE UNIÓN AL RECEPTOR Y LA VESÍCULA DE MEMBRANA EXTERNA DEL MENINGOCOCO B

5

REIVINDICACIONES

1. Una composición vacunal para inducir una respuesta inmune contra el virus SARS-CoV-2 caracterizada porque comprende como antígeno una porción del dominio de unión al receptor (RBD) de la proteína S del SARS-CoV-2, un inmunoestimulante compuesto por vesículas derivadas de la membrana externa (VME) de *Neisseria meningitidis* grupo B y un adyuvante.
2. La composición vacunal según la reivindicación 1 caracterizada porque el antígeno tiene la secuencia SEQ ID NO.1.
3. La composición vacunal según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 donde el RBD está en forma de dímero.
4. La composición vacunal según la reivindicación 3 donde el dímero se forma a través de la unión de las cisteínas C 538 libre.
5. La composición vacunal según la reivindicación 1 donde el adyuvante se selecciona del grupo que comprende:
 - hidróxido de aluminio,
 - fosfato de aluminio y
 - fosfato cálcico.
6. La composición vacunal según la reivindicación 1 donde las vesículas de membrana externa de meningococo B usadas como inmunoestimulantes tienen un tamaño de partículas en un rango entre 150-300 nm.
7. La composición vacunal según la reivindicación 1 donde el RBD está en un rango de dosis de 5-50 µg.
8. La composición vacunal según la reivindicación 1 que además comprende excipientes farmacéuticamente adecuados.
9. Un procedimiento para la obtención de las VME de la reivindicación 6 que comprende las siguientes etapas:
 - a) Solubilizar las VME en agua de calidad farmacéutica por agitación y
 - b) Sonicar las VME a una temperatura menor de 10°C.
10. Uso de la composición vacunal de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en la prevención de la infección por el virus SARS-CoV-2.
11. Uso de la composición vacunal de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en la prevención de la infección por el virus SARS-CoV-2 cuando se requiere que el inicio

de la aparición de anticuerpos específicos contra el virus, siete días después de la inmunización.

5 12. Uso de la composición vacunal de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en la prevención de la infección por el virus SARS-CoV-2 cuando se requiere que una respuesta de anticuerpos neutralizantes y un patrón de respuesta de células tipo Th1 específicos contra el virus, después de dos dosis de la composición vacunal.

10 13. Uso de la composición vacunal de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en la inducción de una respuesta de anticuerpos contra el virus SARS-CoV-2 por vía intramuscular en dosis de RBD de entre 5-50 μ g, VME entre 10-100 μ g, en esquema de inmunización de 1 a 3 dosis.

15

20

25

30