

CONJUGADOS COVALENTES DEL DOMINIO DE UNIÓN AL RECEPTOR DEL VIRUS SARS-COV-2 Y UNA PROTEÍNA PORTADORA Y LAS COMPOSICIONES VACUNALES QUE LOS CONTIENEN.

5 CAMPO DE LA TÉCNICA

La presente invención se relaciona con la biotecnología, específicamente con el campo de la salud humana. Particularmente, describe conjugados covalentes del dominio de unión al receptor del virus SARS-CoV-2 con una proteína portadora, el método para obtener esos conjugados y las composiciones vacunales que los contienen.

10 ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

La enfermedad COVID19 es de muy reciente aparición, en Wuhan, China en diciembre de 2019, donde comenzaron a reportarse 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 a SARS-CoV-2, conocidos como MERS y 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 SARS-CoV-2 es un fragmento de aproximadamente 193 aminoácidos (correspondiente la secuencia 333-527) que contiene el motivo de unión al receptor (RBM, del inglés *receptor binding motive*) que constituye la región por la cual el virus interacciona con el receptor ACE2. El RBD contiene

además, 4 puentes bisulfuros intramoleculares entre las Cisteínas 336-361, 379-432, 391-525 y 480-488, lo que ayuda a crear una estructura muy compacta y estable (Lan y cols (2020), Nature Vol 581: 215-230).

5 El RBD es una molécula pequeña, cuya masa molecular oscila entre 25-27 kDa en función del hospedero donde se expresa y los carbohidratos incorporados, fundamentalmente vinculados a las asparaginas N331 y N343 (Chen WH y cols (2017) Journal of Pharmaceutical Sciences 106: 1961-1970).

10 Las estrategias para las vacunas contra el SARS-CoV-2 incluyen el virus inactivado, construcciones genéticas que contienen el material genético del virus incorporado ya sea en adenovirus o como ARN mensajero, y vacunas basadas en subunidades o fragmentos de proteínas virales expresadas en hospederos modificados genéticamente. En este caso, la molécula preferida es la proteína S, también conocida como proteína Spike, o un fragmento de su estructura, es decir, el RBD. Su principal ventaja es su seguridad, y que esta estrategia se acerca más a la de muchas vacunas en uso, sin embargo, su principal desafío es lograr una respuesta
15 inmune que sea suficiente para proteger de la infección viral.

Hasta el presente (21 de septiembre de 2020) se encuentran en evaluación preclínica 149 candidatos vacunales contra el SARS-CoV-2 y 38 en fase de ensayos clínicos. De ellos, al menos 13 candidatos (5 en fase clínica y 8 en fase preclínica), utilizan el RBD como antígeno específico (*DRAFT landscape of COVID-19 candidate vaccines –21 September 2020*).

20 Estas vacunas consisten en el RBD absorbido en alúmina en altas concentraciones de hasta 50 microgramos por dosis (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04466085?term=NCT04466085&draw=2&rank=1> consultado el 17 de agosto 2020). Otras vacunas usan la proteína RBD que comprende los residuos de aminoácidos del 319-545 expresados en baculovirus y células de
25 insectos, purificados y formulados usando hidróxido de aluminio como adyuvante (Yang J y cols (2020) Nature <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2599-8>). El RBD en su forma monomérica también se ha utilizado en experimentos con animales absorbidos en alúmina, lo que demuestra que puede inducir anticuerpos neutralizantes sin incremento de la enfermedad provocada por anticuerpos Zang J. y cols (2020) <https://doi.org/10.1101/2020.05.21.107565>).

30 Ninguna de las soluciones técnicas mencionadas anteriormente se acerca a la presente invención. Los inventores de la presente invención aprovechan la estructura del RBD para obtener RBD conjugado covalentemente a proteínas portadoras. Estos conjugados pueden ser

obtenidos a partir de cualquier fragmento que comprenda la secuencia 333-527 (SEQ ID NO. 2) o extensiones de la misma.

Sorprendentemente, la respuesta inmune generada contra estos conjugados, es más fuerte que la provocada por el monómero no conjugado de RBD en términos de su cinética y su capacidad de neutralización de virus, medida en un ensayo de neutralización de virus utilizando SARS-CoV-2 y el ensayo de inhibición de unión al receptor ACE2. Estas son características fundamentales en medio del escenario pandémico causado por el SARS-CoV-2. Las composiciones vacunales descritas en la presente invención provocan 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 , por lo que no se esperan los efectos inmunopatológicos reportados para vacunas contra coronavirus que inducen un patrón Th2.

Una de las debilidades de la inmunidad adquirida tras la infección con el coronavirus es la corta duración. Las composiciones vacunales descritas en la presente invención generan una respuesta de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de memoria, particularmente los productores de IFN γ , linfocitos específicos al RBD.

Es procedente establecer respecto a la presente invención que ninguna solución técnica anterior o publicación científica describe conjugados covalentes del RBD a una proteína portadora obtenida por métodos químicos, ni composiciones vacunales basadas en estos conjugados.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Una realización de la presente invención consiste en conjugados covalentes que comprenden el dominio de unión al receptor (RBD) del SARS-CoV-2 y una proteína portadora. Particularmente, estos conjugados se caracterizan porque la relación RBD/proteína portadora está preferiblemente en el rango molar: entre 1-8 unidades de RBD por una proteína portadora. La proteína portadora puede seleccionarse del grupo que comprende: el toxoide tetánico, el toxoide diftérico, y el mutante diftérico CRM197, sin limitarse a éstos. El efecto inmunológico que se logra mediante la conjugación a toxoide tetánico se puede lograr mediante conjugación a las otras proteínas portadoras, por lo que el efecto de esta invención no se limita a toxoide tetánico.

El antígeno RBD utilizado para conjugar puede tener las secuencias aminoacídicas 319-541 (SEQ ID NO. 1), 333-527 (SEQ ID NO. 2) y 328-533 (SEQ ID NO. 3). Particularmente, la SEQ ID NO. 1 puede encontrarse además en forma dimérica. Dicho antígeno RBD puede ser producido en los hospederos que se seleccionan del grupo que comprenden: células de mamíferos, células de insectos, bacterias y levaduras.

- Otra realización de la invención comprende composiciones vacunales para inducir una respuesta inmune protectora contra el virus SARS-CoV-2 que se caracteriza porque comprende conjugados covalentes formados por el dominio de unión al receptor (RBD) del SARS-CoV-2 y una proteína portadora. Estas composiciones vacunales adicionalmente pueden incluir un adyuvante que se selecciona del grupo que comprende cualquier sal mineral como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y fosfato cálcico, entre otros. El conjugado de dichas composiciones vacunales tiene un intervalo de concentración de RBD de 1 a 30 µg por dosis, mientras que el adyuvante está dentro de un intervalo de concentración de 200 a 1500 µg por dosis. Estas composiciones también contienen excipientes farmacéuticamente adecuados.
- 5
- 10 Otra realización de la invención implica un procedimiento para la obtención de conjugados covalentes que comprende las siguientes: A) Funcionalización de la proteína portadora para introducirle grupos tiofilicos, B) Conjugación covalente de proteína portadora al RBD y C) Purificación. Dicho procedimiento adicionalmente puede comprender un paso de Reducción *in situ* de la forma RBD-dimérico previo a la etapa A, particularmente donde se emplee la SEQ ID
- 15 NO. 1 y éste se encuentre en forma dimérica (Figura 1.). Además el procedimiento puede comprender otra etapa de Tiolación del extremo N-terminal del RBD previo a la etapa A, en la que se utilizan las SEQ ID NO: 1-3 (Figura 2.). Los grupos tiofilicos introducidos en la etapa A se seleccionan del grupo que comprende: maleimidos, bromoacetilo, vinilsulfonas, acrilatos, acrilamidas, acrilonitrilos y metaacrilatos.
- 20 Otra realización la presente invención, está relacionada con el uso de las composiciones vacunales mencionadas anteriormente para la prevención de la infección por el virus SARS-CoV-2. Implica, en particular, el uso de las composiciones vacunales descritas en este documento cuando se requiere una respuesta de anticuerpos neutralizantes.
- Finalmente, existe otra realización de la presente invención que consiste en el uso de las
- 25 composiciones vacunales antes mencionadas para inducir una respuesta temprana de anticuerpos IgG contra el virus SARS-CoV-2 aplicando un esquema de inmunización por vía intramuscular que cubre de 1 a 3 inyecciones, que van desde 1 a 30 µg de RBD.
- La presente invención proporciona ahora en un primer aspecto un conjugado covalente que comprende el dominio de unión al receptor de SARS-CoV-2 (RBD) y una proteína transportadora.
- 30 En una realización preferida del conjugado covalente de la invención, la proteína transportadora se selecciona del grupo que comprende toxoide tetánico, toxoide diftérico y toxoide diftérico mutante CRM197 (Figuras 3 y 4).

En una realización preferida del conjugado covalente de la invención, la relación molar de proteína portadora de RBD está dentro del intervalo de 1 a 8 RBD por proteína portadora (Figura 5).

5 En una realización preferida del conjugado covalente de la invención, el RBD se selecciona del grupo que comprende las SEQ ID NO: 1, 2 y 3. En una realización preferida del conjugado covalente de la invención, el RBD de SEQ ID NO: 1 se usa en su forma dimérica.

En una realización preferida del conjugado covalente de la invención, el RBD se produce en un huésped seleccionado del grupo que comprende o consiste en células de mamífero (preferiblemente no humanas), células de insectos, bacterias y levaduras.

10 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición de vacuna que comprende el conjugado covalente de la invención como se describió anteriormente. La composición de la vacuna se usa preferiblemente para inducir una respuesta inmune contra el SARS-CoV-2.

En una realización preferida de la composición de vacuna de la invención, la composición de vacuna incluye además un adyuvante seleccionado del grupo que comprende o consiste en
15 hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y fosfato de calcio.

En una realización preferida de la composición de vacuna de la invención, el conjugado está en un intervalo de concentración de RBD 1-30 μg por dosis.

En una realización preferida de la composición de vacuna de la invención, el adyuvante está en un intervalo de concentración de 200-1500 μg por dosis.

20 En una realización preferida de la composición de vacuna de la invención, la composición de vacuna incluye además excipientes farmacéuticos apropiados.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para la preparación del conjugado covalente de la invención como se describe anteriormente, el método comprende los pasos de: proporcionar una proteína portadora y un RBD, en el que el RBD puede estar en forma
25 monomérica o dimérica. , funcionalizando la proteína transportadora mediante la introducción de grupos tiofílicos, conjugando covalentemente la proteína transportadora al RBD y purificando el conjugado obtenido.

En una realización preferida del método para la preparación del conjugado covalente de la invención en el que se usa un dímero RBD, el método comprende un paso adicional de reducción
30 del dímero RBD, preferiblemente in situ antes de su conjugación con la proteína transportadora, preferiblemente antes de la funcionalización de la proteína transportadora mediante la introducción de grupos tiofílicos.

En una realización preferida del método para la preparación del conjugado covalente de la invención, se puede usar el RBD de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-3, más preferiblemente, se utiliza la SEQ ID NO: 1 como RBD.

5 En una realización preferida del método de preparación del conjugado covalente de la invención, los grupos tiofílicos introducidos se seleccionan del grupo que comprende o consiste en maleimida, bromoacetilo, vinilsulfona, acrilato, acrilamida, acrilonitrilo y metacrilato. En otro aspecto, la presente invención proporciona un conjugado obtenido mediante el método para la preparación del conjugado covalente de la invención como se describe anteriormente.

10 En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de la composición de vacuna de la invención para la prevención de la infección con el virus SARS-CoV-2, en particular la prevención de la enfermedad causada por la infección por el virus SARS-CoV-2.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para prevenir la enfermedad causada por la infección por el virus del SARS-CoV-2 que comprende administrar a un sujeto una dosis terapéuticamente eficaz de la composición de vacuna de la invención como se describe
15 anteriormente.

Preferiblemente, en el uso de prevención de infección o método de prevención de enfermedad de acuerdo con la invención, el uso o método es para la prevención de infección o enfermedad por el virus SARS-CoV-2 en sujetos que necesitan una respuesta de anticuerpos neutralizantes después de haber recibido dos dosis o vacunas de la composición de la vacuna.

20 En realizaciones preferidas del uso y método de prevención de infecciones o enfermedades según la invención, el uso o método es inducir una respuesta de anticuerpos contra el SARS-CoV-2 aplicando un programa de vacunación intramuscular de 1 a 3 dosis. Preferiblemente, en una dosis de vacunación programada según la invención, la cantidad de RBD en una dosis es de 1 a 30 µg.

25

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Esquema de conjugación selectiva de sitio del dominio de unión al receptor de SARS-Cov-2 (RBD) al toxoide tetánico (TT) activado con grupos de maleimida tiofílica. La conjugación tiene lugar en el tiol libre de Cys538, que está espacialmente distante del motivo de unión al
30 receptor (representado en rojo) y, por lo tanto, no afecta la antigenicidad del RBD.

Figura 2. Esquema de conjugación selectiva N-terminal del dominio de unión del receptor de SARS-Cov-2 (RBD) al toxoide tetánico (TT) activado con grupos de maleimida tiofílica. La tiolación N-terminal de las tomas RBD se lleva a cabo con los nuevos reactivos de tioacetil-piridinocarbaldehído (desarrollados internamente) que modifica selectivamente el grupo amino N-terminal. El residuo N-terminal está espacialmente distante del motivo de unión al receptor (representado en rojo) y, por lo tanto, no afecta la antigenicidad del RBD.

Figura 3. Dibujo del conjugado RBD basado en el RBD (319-541) conjugado en Cys538 usando A) toxoide tetánico, B) toxoide diftérico o C) material de reacción cruzada 197 (CRM197) como proteína transportadora.

Figura 4. Dibujo del conjugado RBD basado en el RBD (328-533) conjugado en el extremo N-terminal usando A) toxoide tetánico, B) toxoide diftérico o C) material de reacción cruzada 197 (CRM197) como proteína transportadora.

Figura 5. Representación de conjugados RBD-TT con un promedio de 2, 4 y 6 unidades de RBD por unidad de toxoide tetánico. También se obtuvieron conjugados que llevan un promedio de 8, 10 o 13 unidades RBD. Las secuencias de codificación para la proteína RBD se sintetizan y subclonan en un vector de expresión adecuado, preferentemente pcDNA3.1. Las secuencias aminoacídicas seleccionadas del RBD son las correspondientes a las SEQ ID NO. 1- 3 o extensiones de las mismas. Las construcciones que contienen las proteínas objetivo pueden ser expresadas en un hospedero de los tradicionalmente utilizados en Biotecnología: células de mamíferos (CHO, HEK293), células de insectos, bacterias y levaduras, preferiblemente en células CHO.

Figura 6. Cromatogramas HPSEC Superdex 75, que muestran la reducción del dímero de RBD (SEQ ID NO: 1) al monómero RBD, y se compara con un perfil de referencia del monómero RBD.

Figura 7. SDS-PAGE al 10% de la forma nativa de RBD y el RBD derivado de la reducción del dímero de RBD (SEQ ID NO: 1). R: La muestra se incubó en tampón de muestra reductor antes de aplicarse al gel. NR: La muestra se aplicó en tampón de muestra no reductor.

Figura 8. Antigenicidad del monómero obtenido por reducción del dímero RBD (SEQ ID NO: 1) con tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP), en comparación con la antigenicidad del monómero y dímero nativos.

Figura 9. Cromatogramas HPSEC Superdex 200 de los conjugados RBD-TT 2 y 3 purificados (Ejemplo 2), en comparación con el cromatograma de toxoide tetánico.

Figura 10. Reconocimiento del conjugado RBD (319-541) -TT por el receptor ACE-2, analizado por ELISA (A) y por dot blot usando anticuerpos policlonales anti-RBD (B).

- 5 Figura 11. Cinética de anticuerpos IgG anti-RBD inducidos después de la vacunación los días 0 y 14 con conjugado RBD-TT formulado o no en Al (OH) 3, en comparación con RBD formulado en Al (OH) 3. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los grupos en cada momento.

- 10 Figura 12. Cinética de anticuerpos IgG anti-TT inducidos tras la vacunación los días 0 y 14 con el conjugado RBD-TT formulado o no en Al (OH) 3.

Figura 13. Inhibición de la unión de RBD-ACE2 determinada en un ELISA con diluciones de anticuerpos inducidas el día 28 en ratones inmunizados los días 0 y 14 con las composiciones de vacuna del conjugado RBD-TT formulado o no en Al (OH) 3, comparado al RBD formulado en Al (OH) 3.

- 15 Figura 14. Actividad neutralizante anti-SARS-CoV-2 el día 28 de los sueros de los ratones inmunizados con dos dosis del conjugado RBD-TT formulado o no en Al (OH) 3, comparado con el RBD formulado en Al (OH) 3. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

- 20 Figura 15. Producción de IFN γ , IL4 e IL17A en células de bazo de ratones inmunizados con RBD-TT formulado en Al (OH) 3 o con el placebo (Al (OH) 3), según se determina mediante un ELISA cuantitativo. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0.05$), según la prueba de Tukey.

- Figura 16. Respuesta de células de memoria inducida en ratones inmunizados con dos dosis del conjugado RBD-TT formulado en Al (OH) 3. (A) linfocitos T CD8 + CD44 ++, (B) linfocitos T CD8 productores de IFN γ , (C) linfocitos T de memoria CD4 + CD44 ++ y (D) linfocitos T CD4 productores de IFN γ . RBD / RBD: Grupo que recibió dos dosis (T0, T14) de RBD-TT y los
25 linfocitos extraídos fueron estimulados in vitro con RBD. Alum / RBD: Grupo que recibió dos dosis (T0, T14) de Alum y los linfocitos extraídos fueron estimulados in vitro con RBD.

Figura 17. Cromatogramas HPSEC Superdex 75, que muestran la tiolación selectiva del residuo N-terminal del monómero RBD (SEQ ID NO: 3), en comparación con el perfil de referencia del monómero RBD.

Figura 18. (A) Cromatogramas HPSEC Superdex 75, que muestran la conjugación del monómero RBD (SEQ ID NO: 3) tiolado en el residuo N-terminal (panel superior), la mezcla de reacción de 16 h de RBD-TT 4 (centro panel) y el conjugado purificado RBD-TT 4 (panel inferior). (B) Cromatogramas HPSEC Superdex 200 del conjugado purificado RBD-TT 4, en comparación con el toxoide tetánico.

Figura 19. Reconocimiento del conjugado RBD (328-533) -TT por el receptor ACE-2, analizado (A) por una prueba ELISA y (B) por anticuerpos policlonales anti-RBD, probado por dot blott.

Figura 20. Anticuerpos IgG anti-RBD inducidos 14 días (T42) después de la inmunización los días 0 y 28 con vacuna conjugada en el ensayo clínico de fase II (19-80 años) y el ensayo clínico de fase I / II (3-18 años / o). PCP: Panel de sueros de convalecientes pediátricos.

Figura 21. IgG anti-RBD de muestras de saliva de sujetos vacunados o no vacunados

15 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El término "SARS-CoV-2", como se usa en este documento, se refiere al síndrome respiratorio agudo severo (SARS) coronavirus 2 (SARS-CoV-2), el virus causante de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19). Las pruebas para detectar casos positivos de SARS-CoV-2 pueden basarse en la detección de secuencias de ARN del virus mediante NAAT, como la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real (rRT-PCR) con confirmación mediante secuenciación de ácidos nucleicos cuando sea necesario. Los genes virales objetivo hasta ahora incluyen los genes N, E, S y RdRP.

El término enfermedad del SARS-CoV-2" y "COVID" se usan aquí de manera intercambiable, y se refieren a una enfermedad infecciosa viral causada por el síndrome respiratorio agudo severo coronavirus-2 (SARS-CoV-2). Los síntomas comunes de COVID-19 incluyen fiebre, tos y dificultad para respirar. El dolor muscular, la producción de esputo y el dolor de garganta son menos comunes. Si bien la mayoría de los casos provocan síntomas leves, algunos progresan a neumonía grave e insuficiencia multiorgánica. La infección generalmente se transmite de una persona a otra a través de las gotitas respiratorias que se producen al toser. También se puede propagar al tocar superficies contaminadas y luego tocarse la cara.

El término "dominio de unión al receptor (RBD)", como se usa en este documento, se refiere al dominio de unión al receptor (RBD) de una proteína de pico (S) de coronavirus de un coronavirus, e incluye una referencia a una parte de la proteína de pico (S) de coronavirus que está involucrado en la unión viral a un receptor en una célula del sujeto y su posterior entrada en la célula. El receptor celular puede ser un receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2). Preferiblemente, el RBD comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1-3. Dentro de la definición de RBD también se prevé un RBD que es una parte antigénica de la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1-3. Un RBD como se describe en el presente documento se puede modificar en el sentido de que se añaden, sustituyen o eliminan 1-100, preferiblemente 1-50, más preferiblemente 1-10 residuos de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1-3 o una parte antigénica del mismo, preferiblemente en el que dicho RBD modificado se une a un producto de una respuesta inmune, preferiblemente un anticuerpo, que se provoca cuando un sujeto se inmuniza con un conjugado como se describe en este documento, en el que el RBD de dicho conjugado comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1-3. Por tanto, el término RBD incluye una referencia a una secuencia que tiene un 80%, preferiblemente un 90%, más preferiblemente un 95% de identidad de secuencia con las SEC ID NO: 1-3 y se une a un producto de una respuesta inmune, preferiblemente un anticuerpo, que se provoca cuando un el sujeto se inmuniza con un conjugado como se describe en este documento, en el que el RBD de dicho conjugado comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1-3.

En aspectos de esta invención, el término "un dominio de unión al receptor (RBD) de una proteína de pico (S) de coronavirus" se refiere únicamente a la porción RBD de la proteína de pico (S) de coronavirus completo.

El término "proteína de pico (S)", o el término equivalente "glucoproteína de pico (S)", se refiere a la proteína S del coronavirus que consta de una subunidad S1 (la cabeza N-terminal) y una subunidad S2 (el tallo C-terminal). La subunidad S1 media la unión y entrada del virus a través de su dominio S1A N-terminal (que comprende ácidos siálicos, un factor de unión viral) y su dominio de unión al receptor C-terminal (RBD), que se une al receptor ACE2 del SARS. La subunidad S2 está más conservada y media la fusión viral a la célula huésped a través del péptido de fusión (FP) y las dos repeticiones de heptada HR1 y HR2. La unión de la proteína RBD del SARS-CoV S a los receptores humanos ACE2 y CLEC4M / DC-SIGNR da como resultado la internalización del virus en los endosomas de la célula huésped.

El término "proteína portadora", como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína inmunogénica a la que se puede unir un antígeno tal como una proteína, oligosacárido o polisacárido. Cuando se une a un portador, la molécula unida puede volverse más inmunogénica. La unión covalente de una molécula a un portador confiere una mayor inmunogenicidad y dependencia de las células T.

Como se usa en este documento, el término "proteína" se usa en este documento para designar una serie de residuos de aminoácidos, conectados entre sí por enlaces peptídicos entre los grupos alfa-amino y carboxi de residuos adyacentes, también conocidos como "polipéptido".

Los términos "proteína" y "polipéptido" se refieren a un polímero de aminoácidos, incluidos aminoácidos modificados (por ejemplo, fosforilados, glicosilados, etc.) y análogos de aminoácidos, independientemente de su tamaño o función. "Proteína" y "polipéptido" se usan a menudo en referencia a polipéptidos relativamente grandes, mientras que el término "péptido" se usa a menudo en referencia a polipéptidos pequeños, pero el uso de estos términos en la técnica se superpone.

En el contexto de la presente invención, los términos "proteína", "polipéptido" y "péptido" son completamente intercambiables. Debe entenderse que las proteínas, incluidos los antígenos (RBD) de la invención, pueden diferir de las secuencias exactas ilustradas y descritas en el presente documento. Por tanto, la invención contempla delecciones, adiciones y sustituciones de las secuencias mostradas, siempre que las secuencias funcionen de acuerdo con los métodos de la invención. A este respecto, las sustituciones particularmente preferidas serán generalmente de naturaleza conservadora, es decir, aquellas sustituciones que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos. Por ejemplo, los aminoácidos generalmente se dividen en cuatro familias: (1) ácidos: aspartato y glutamato; (2) básico - lisina, arginina, histidina; (3) no polar - alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polar no cargado: glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. La fenilalanina, el triptófano y la tirosina a veces se clasifican como aminoácidos aromáticos. Es razonablemente predecible que una sustitución aislada de leucina por isoleucina o valina, o viceversa; un aspartato con un glutamato o viceversa; una treonina con una serina o viceversa; o un reemplazo conservador similar de un aminoácido con un aminoácido estructuralmente relacionado, no tendrá un efecto importante sobre la actividad biológica. Las proteínas que tienen sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que las secuencias ilustradas y descritas pero que poseen sustituciones de aminoácidos menores que no afectan sustancialmente a la inmunogenicidad de la proteína están, por tanto, dentro del alcance de la invención. Se considera que una identidad

de secuencia en toda la longitud de la proteína RBD de al menos el 90%, preferiblemente al menos el 95%, 96%, 97%, 98% o 99% es una variante funcional de la proteína RBD de las SEQ ID NO. : 1-3 y puede usarse en aspectos de esta invención.

5 El término "% de identidad de secuencia" se define aquí como el porcentaje de nucleótidos en una secuencia de ácido nucleico, o de aminoácidos en una secuencia de aminoácidos, que es idéntica a los nucleótidos, resp. aminoácidos, en un ácido nucleico o secuencia de aminoácidos de interés, después de alinear las secuencias y, opcionalmente, introducir espacios, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia. Los métodos y programas informáticos para alineamientos son bien conocidos en la técnica. La identidad de
10 secuencia se calcula sustancialmente sobre la longitud total, preferiblemente la longitud completa (completa) de una secuencia de aminoácidos de interés. El experto entenderá que los residuos de aminoácidos consecutivos en una secuencia de aminoácidos se comparan con los residuos de aminoácidos consecutivos en otra secuencia de aminoácidos.

15 El término "toxoides tetánico", como se usa en este documento, se refiere al péptido toxoide tetánico bien conocido, péptido que representa un epítipo de los residuos 830-844 de la toxina tetánica. Se ha demostrado que esta secuencia se une a múltiples alelos HLA-DR y se ha descrito como universalmente inmunogénica. La secuencia de aminoácidos es QYIKANSKFIGITEL.

20 El término "toxoides diftérico", como se usa en este documento, se refiere a la exotoxina inactivada secretada por *Corynebacterium diphtheriae*, una cadena polipeptídica única de 535 aminoácidos que consta de dos subunidades unidas por puentes disulfuro. El toxoide diftérico se produce en todo el mundo de forma estándar; en los Estados Unidos, los procedimientos de producción y prueba se especifican en el Código de Regulaciones Federales.

25 El término "mutante de toxoide diftérico CRM197", como se usa en este documento, se refiere a un mutante no tóxico de la toxina diftérica, usado regularmente como proteína portadora de polisacáridos y haptenos para hacerlos inmunogénicos. Una sola transición G-> A en la secuencia del toxoide diftérico de tipo salvaje conduce a la sustitución de glicina-52 por ácido glutámico (Giannini et al. 1984 Nucleic Acids Res. 12 (10): 4063-4069),

El término "covalente", como se usa en este documento, se refiere a un enlace químico en el que dos átomos comparten uno o más pares de electrones que los mantienen juntos.

30 El término "conjugado covalente", como se usa en este documento, se refiere a un compuesto en el que un polipéptido antigénico está unido covalentemente a una proteína portadora.

El término "conjugar covalentemente", como se usa en este documento, se refiere al paso de preparar el conjugado mediante reacciones químicas.

El término "vacuna", como se usa en este documento, incluye una referencia a una composición de restos antigénicos, que generalmente consisten en agentes infecciosos vivos modificados (atenuados) o inactivados, o alguna parte de los agentes infecciosos, que se administra, con mayor frecuencia, con un adyuvante, en el cuerpo para producir inmunidad activa. La presente invención proporciona composiciones inmunogénicas que comprenden un conjugado como se describió anteriormente en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dicho vehículo puede ser un líquido acuoso o una composición en aerosol.

El término "dosis", como se usa en este documento, se refiere a una cantidad o cantidad medida del conjugado o composición de la invención administrada o recomendada para ser administrada en un momento particular.

El término "adyuvante", como se usa en el presente documento, incluye referencia a un compuesto o compuestos que, cuando se usan en combinación con antígenos de vacuna específicos en formulaciones, aumentan o alteran o modifican de otro modo las respuestas inmunes resultantes. Preferiblemente, el adyuvante es un alumbre (una sal de aluminio) tal como hidróxido de aluminio.

El término "excipiente farmacéutico", como se usa en este documento, se refiere a un material tal como un adyuvante, un portador, un agente tamponador y regulador del pH, un agente regulador de la tonicidad, un agente humectante, un conservante y similares. Los excipientes de vacunas se describen, por ejemplo, en regulaciones gubernamentales tales como la Farmacopea Europea y la American 9 CFR, y en manuales tales como: The Handbook of Pharmaceutical Excipients (R. Rowe et al., Pharmaceutical press 2012, ISBN 08571 10276); Remington: la ciencia y la práctica de la farmacia (2000, Lippincot, EE. UU., ISBN: 683306472).

El término "reducción in situ", como se usa en el presente documento, se refiere a la conversión de dímero en monómero de RBD como se describe en el presente documento. La reducción de dímeros se lleva a cabo preferiblemente usando tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP). Preferiblemente, la reducción es in situ, lo que significa que el dímero se mezcla con el TCEP y luego con la proteína transportadora, sin ninguna etapa de purificación intermedia.

El término "tiolación", como se usa en este documento, se refiere a la introducción de un grupo sulfhidrilo (SH) en el residuo N-terminal o N-terminal de RBD. La tiolación se puede lograr

haciendo reaccionar el RBD con un exceso de 2-tioacetil-piridin-2-carboxaldehído seguido de tratamiento con hidroxilamina.

El término "funcionalizar", como se usa en este documento, se refiere a la introducción de uno o más grupos tiofílicos en la proteína portadora. Los grupos tiofílicos pueden incluir maleimidas, bromoacetilos, vinilsulfonas, acrilatos, acrilamidas, acrilonitrilos y metacrilatos. Un experto en la técnica está bien familiarizado con los métodos para introducir uno o más grupos tiofílicos en una proteína. La funcionalización puede conseguirse, por ejemplo, haciendo reaccionar la proteína portadora con éster de N-hidroxisuccinimida del ácido maleimido-propiónico en un tampón apropiado. En aspectos de esta invención, se deja que el RBD tiolado reaccione con la proteína portadora funcionalizada con el grupo o grupos tiofílicos para formar el conjugado de la invención. Dependiendo de la estequiometría de la reacción, los conjugados obtenidos contendrán de una a ocho unidades RBD por unidad de proteína transportadora. El procedimiento de conjugación descrito para esta invención es quimiosselectivo y específico de residuo. Un conjugado covalente de acuerdo con la presente invención preferiblemente no es una proteína de fusión, en la que el RBD y la proteína portadora están unidos a través de un enlace peptídico.

Como se usa en el presente documento, el término "administrar" se refiere a la colocación de un compuesto o composición como se describe en el presente documento en un sujeto mediante un método o ruta que da como resultado la administración al menos parcial del conjugado en un sitio deseado. Las composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos descritos en el presente documento se pueden administrar mediante cualquier ruta apropiada que dé como resultado un tratamiento eficaz en el sujeto. Preferiblemente, la administración es por inyección, preferiblemente intramuscular.

Como se usa en este documento, un "sujeto" significa un animal humano o no humano. Por lo general, el animal no humano es un vertebrado, como un primate, un roedor, un animal doméstico o un animal de caza. Los primates incluyen chimpancés, monos cinomólogos, monos araña y macacos, por ejemplo, Rhesus. Los roedores incluyen ratones, ratas, marmotas, hurones, conejos y hámsteres. Los animales también incluyen armadillos, erizos y camellos, por nombrar algunos. Los animales domésticos y de caza incluyen vacas, caballos, cerdos, ciervos, bisontes, búfalos, especies felinas, por ejemplo, gato doméstico, especies caninas, por ejemplo, perro, zorro, lobo, especies de aves, por ejemplo, pollo, emú, avestruz y pescado. por ejemplo, trucha, bagre y salmón. En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero, por ejemplo, un primate, por ejemplo, un ser humano.

Los términos "individuo", "paciente" y "sujeto" se usan indistintamente en el presente documento. Preferiblemente, el sujeto es un mamífero. El mamífero puede ser un ser humano, un primate, un ratón, una rata, un perro, un gato, un caballo, una vaca o un cerdo, pero no se limita a estos ejemplos. Se pueden usar ventajosamente mamíferos distintos de los humanos como sujetos que representan modelos animales de una afección determinada. Preferiblemente, un sujeto es un ser humano. Un sujeto puede ser hombre o mujer. Un sujeto puede ser uno a quien se le ha diagnosticado o identificado previamente que padece o tiene una afección que necesita tratamiento y, opcionalmente, ya se ha sometido a tratamiento. Alternativamente, un sujeto también puede ser uno a quien no se le haya diagnosticado previamente una afección. Por ejemplo, un sujeto puede ser uno que exhibe uno o más factores de riesgo o un sujeto que no exhibe factores de riesgo. Un "sujeto que necesita" tratamiento para una afección particular puede ser un sujeto que tiene esa afección, diagnosticado con esa afección o en riesgo de desarrollar esa afección.

El término "prevención de la infección con el virus SARS-CoV-2", como se usa en este documento, y el término "prevención de la enfermedad causada por la infección por el virus SARS-CoV-2", como se usa en este documento, se refieren a la prevención o el tratamiento de la enfermedad COVID-19, o una enfermedad causada por el virus SARS-CoV-2 o una variante del mismo.

Como se usa en el presente documento, los términos "tratar", "tratamiento", "tratar" o "mejora" se refieren a tratamientos terapéuticos, en los que el objeto es revertir, aliviar, mejorar, inhibir, ralentizar o detener la progresión o gravedad de una enfermedad. condición asociada con una enfermedad o trastorno, p. ej. cáncer o inflamación.

El término "tratar" incluye reducir o aliviar al menos un efecto o síntoma adverso de una afección, enfermedad o trastorno. El tratamiento es generalmente "efectivo" si se reducen uno o más síntomas o marcadores clínicos. Alternativamente, el tratamiento es "efectivo" si la progresión de una enfermedad se reduce o se detiene. Es decir, "tratamiento" incluye no solo la mejora de los síntomas o marcadores, sino también el cese, o al menos la desaceleración del progreso o empeoramiento de los síntomas en comparación con lo que se esperaría en ausencia de tratamiento. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, alivio de uno o más síntomas, disminución de la extensión de la enfermedad, estado estabilizado (es decir, sin empeoramiento) de la enfermedad, retraso o enlentecimiento de la progresión de la enfermedad, mejoría o paliación. del estado de la enfermedad, remisión (ya sea parcial o total) y / o disminución de la mortalidad, ya sea detectable o indetectable.

El término "tratamiento" de una enfermedad también incluye proporcionar alivio de los síntomas o efectos secundarios de la enfermedad (incluido el tratamiento paliativo).

El término "cantidad eficaz" como se usa en este documento se refiere a la cantidad de antígeno de vacuna necesaria para aliviar al menos uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno, y se refiere a una cantidad suficiente de composición farmacológica para proporcionar el efecto deseado.

Por tanto, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de antígeno de vacuna que es suficiente para producir un efecto particular cuando se administra a un sujeto típico. Una cantidad eficaz como se usa aquí, en varios contextos, también incluiría una cantidad suficiente para retrasar el desarrollo de un síntoma de la enfermedad, alterar el curso de un síntoma de enfermedad (por ejemplo, pero no limitado a, ralentizar la progresión de un síntoma de enfermedad o su gravedad), o revertir un síntoma de la enfermedad. Por lo tanto, generalmente no es factible especificar una "cantidad efectiva" exacta. Sin embargo, para cualquier caso dado, una "cantidad eficaz" apropiada puede ser determinada por un experto en la técnica usando sólo experimentación de rutina. Preferiblemente, una cantidad eficaz provoca una respuesta de anticuerpos neutralizantes en el sujeto.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad de un agente terapéutico para tratar, mejorar, contrarrestar, inhibir o prevenir un trastorno o afección deseados, o para exhibir un efecto terapéutico o profiláctico detectable. La cantidad eficaz precisa necesaria para un sujeto dependerá del tamaño y la salud del sujeto, la naturaleza y extensión de la afección y la terapéutica o combinación de terapias seleccionadas para la administración. La cantidad terapéuticamente eficaz para una situación dada se puede determinar mediante experimentación de rutina.

El término "respuesta de anticuerpos neutralizantes" se refiere a la generación de anticuerpos en un sujeto que se unen y reducen o disminuyen la actividad de una proteína extraña, p. el RBD de SARS-CoV-2. La actividad de la proteína extraña puede reducirse en una cantidad detectable, por ejemplo, 10%, 25%, 50%, 75% o 100% (es decir, completamente inactivada), por ejemplo, en comparación con la actividad de la proteína extraña en la ausencia o antes de provocar la respuesta del anticuerpo neutralizante. La actividad de la proteína extraña dependerá de la proteína extraña que se puede determinar mediante cualquier método conocido en la técnica.

El término "vacunación", como se usa en este documento, se refiere a la administración de una vacuna para inducir una respuesta de anticuerpos neutralizantes por parte del sistema inmunológico del receptor con el fin de desarrollar protección contra una enfermedad.

El término "farmacéuticamente aceptable" se emplea en el presente documento para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones y / o formas de dosificación que, dentro del alcance del buen juicio médico, son adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesos. toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, acorde con una relación beneficio / riesgo razonable.

Método de obtención del antígeno RBD

Las secuencias codificantes de la proteína RBD se sintetizan y subclonan en un vector de expresión apropiado, preferiblemente pcDNA3.1. Las secuencias de aminoácidos de RBD seleccionadas son SEQ ID NO: 1-3 o extensiones de las mismas. Las construcciones que contienen proteínas diana pueden expresarse en uno de los huéspedes usados tradicionalmente en biotecnología, a saber, células de mamífero (CHO, HEK293), células de insectos, bacterias y levaduras, preferiblemente células CHO.

La proteína objeto expresado se recolecta por centrifugación y filtración; se purifica en una columna de afinidad, preferiblemente una columna de Ni-Sepharose, seguida de una purificación por cromatografía de exclusión por tamaño, preferiblemente en Superdex 200. La proteína purificada se analiza aplicando métodos apropiados como SDS-PAGE, HPSEC y MS para determinar tamaño, pureza, identidad y secuencia de aminoácidos, entre otras características moleculares.

Para obtener conjugados covalentes con proteínas transportadoras, los inventores capitalizan la estructura del RBD, que es una proteína globular que contiene 195 aminoácidos (secuencia Thr333-Pro527, SEQ ID NO: 2). Dicha secuencia contiene cuatro puentes disulfuro intramoleculares entre cisteínas (Cys336-Cys361, Cys379-Cys432, Cys391-Cys525 y Cys480-Cys488), creando una estructura muy compacta y estable. Esta secuencia constituye la estructura biológicamente relevante que se utilizará para la conjugación del RBD ya que contiene los cuatro epítomos inmunodominantes descritos para esta molécula, así como el motivo de unión al receptor. Estos conjugados pueden obtenerse a partir de cualquier fragmento que comprenda la secuencia 333-527 o extensiones de la misma.

Además, la construcción genética utilizada para producir el RBD puede incluir una extensión en uno o ambos extremos terminales de la secuencia 333-527, ya sea en el N-terminal en cualquiera de los aminoácidos de 333 a 300, o en el C -terminus en la región de 527-560 aminoácidos. Es posible activar uno de los extremos terminales sin afectar la estructura biológicamente relevante mediante la propia construcción genética, específicamente estirando la secuencia para incluir uno de los aminoácidos naturales que se consideran activos, por ejemplo la cisteína 538. Otra

solución consiste en en la introducción de grupos funcionales activos en uno de los extremos terminales; un ejemplo de esto es la funcionalización del grupo tiol del aminoácido N-terminal, por ejemplo, en la arginina 328 de la secuencia 328-533 RBD (SEQ ID NO: 3).

La secuencia de aminoácidos de la proteína diana de SEQ ID NO: 1 contiene 9 cisteína, incluidas
5 8 implicadas en los 4 puentes disulfuro intramoleculares (Cys336-Cys361, Cys379-Cys432, Cys391-Cys525 y Cys480-Cys488), lo que da como resultado un Estructura muy compacta y estable. Durante la purificación del RBD y en presencia de aire (condiciones oxidantes suaves), el RBD de SEQ ID NO: 1 puede dimerizarse formando un puente disulfuro entre dos cisteínas libres en la posición 538 de dos moléculas RBD. Sin embargo, si el RBD se mantiene en una
10 atmósfera de gas inerte (es decir, nitrógeno o argón), la cisteína 538 no reacciona, el RBD permanece en su forma monomérica y, por lo tanto, puede estar involucrado en reacciones químicas con grupos tiofílicos

Método de obtención de conjugados covalentes RBD a una proteína portadora

La proteína portadora puede seleccionarse del grupo que comprende el toxoide tetánico, toxoide
15 diftérico y mutante diftérico CRM197, o cualquier otra proteína que cumpla esa función para uso en vacunas humanas. Los métodos de obtención y caracterización de estas proteínas portadoras pueden ser encontrados en la literatura existente.

El procedimiento de conjugación descrito en la presente invención es quimio-selectiva y residuo específica. Dicho procedimiento comprende de 3 etapas. La primera etapa (A) involucra la
20 funcionalización de la proteína portadora para introducirle grupos tiofílicos, preferiblemente maleimidos, aunque pueden emplearse cualquiera de los grupos tiofílicos conocidos: bromoacetilo, vinilsulfonas, acrilatos, acrilamidas, acrilonitrilos y metacrilatos. La funcionalización puede realizarse empleando éster N-hidroxisuccinimídico del ácido maleimidopropiónico (EMP) en dimetilsulfóxido (DMSO) en una relación molar con la proteína entre 100-200, en una solución
25 tampón adecuada. La proteína funcionalizada se purifica por diafiltración empleando membranas con un valor de corte adecuado según la proteína que se trate y la extensión de la funcionalización se determina por el método de Ellman modificado.

La etapa (B) comprende la conjugación covalente del RBD a la proteína portadora funcionalizada las cuales se adicionan a la mezcla de reacción en una relación masa:masa de 0.2-9.4.0 RBD:
30 proteína portadora (w:w), en una solución tampón adecuada, agitación suave entre 4-18 h a 5 ± 3 °C en atmósfera de inerte. Para bloquear los grupos tiofílicos remanentes se adiciona cistamina en una proporción adecuada.

La etapa (C) comprende la purificación de los conjugados obtenidos que puede realizarse por diafiltración con membrana con valor de corte adecuado según la proteína portadora de la que se trate.

Para la conjugación puede utilizarse RBD de la SEQ ID NO. 1 tanto en su forma monomérica como en su forma dimérica. Como parte de la presente invención, se introduce un paso previo a la etapa (A) que incluye la ruptura del puente bisulfuro intermolecular que forma el dímero de RBD emplean condiciones reductoras suaves utilizando un agente reductor de enlaces bisulfuro, preferiblemente ditioneitol (DTT) o tris-(2-carboxietil) fosfina (TCEP) en el rango de concentración de 125 μ M- 420 μ M, durante 5-20 minutos y a temperaturas de 0-23°C. Estas condiciones provocan la ruptura selectiva de este puente sin afectar los 4 puentes bisulfuro intramoleculares señalados anteriormente. La reducción del dímero a monómero puede ser comprobada por HPSEC mientras que la no afectación de los 4 puentes bisulfuro intramoleculares se comprueba por SDS-PAGE y la Antigenicidad por ELISA indirecto.

Otra realización de la presente invención, comprende un paso de tiolación por el residuo N-terminal del RBD previo a la etapa A. Este procedimiento conlleva la reacción con 2-tioacetilpiridino-2-carbaldehído en exceso (20-50 equivalentes con respecto al RBD) entre 12 y 48 horas de reacción y una temperatura de 23-37°C; seguido de lavados y tratamiento con exceso de hidroxilamina a temperatura ambiente, durante 1-5 horas de reacción.

Dependiendo de la estequiometría utilizada, los conjugados obtenidos contienen desde una a ocho unidades de RBD en la nueva molécula.

Composiciones vacunales y métodos de administración:

Las composiciones vacunales contra el virus SARS-COV-2 basadas en los conjugados covalentes del dominio de unión al receptor a una proteína portadora se administran por vía intramuscular o subcutánea, en dosis de RBD entre 1-30 μ g, preferentemente entre 5-25 μ g. Las composiciones vacunales pueden contener como adyuvante cualquier sal mineral como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y fosfato cálcico sin limitarse a estos, en dosis entre 200-1500 μ g, preferentemente entre 500-1000 μ g. Las composiciones vacunales comprenden excipientes farmacéuticamente adecuados que pueden regular el pH entre ellos tampones fosfatos en rango de concentraciones entre 3,0-7,0 mM, soluciones isotónicas como por ejemplo el cloruro de sodio en rango de concentraciones entre 50-150 mM, y conservantes tales como tiomersal, fenol, 2-fenoxietanol, parahidroxibensoato de metilo, formaldehído, m-cresol y otros metil y propil prabenos, preferiblemente tiomersal.

Estas formulaciones de composición de vacuna se administran preferiblemente siguiendo un esquema de 1 a 3 dosis, preferiblemente cada 7 a 28 días, más preferiblemente cada 14 a 28 días, más preferiblemente cada 21 a 28 días. Preferiblemente, hay al menos un intervalo de una a tres semanas, preferiblemente un intervalo de al menos dos semanas, entre dosis consecutivas. Una dosis única para administración comprende preferiblemente una cantidad de RBD de 1 a 30 µg. Un recipiente, como un matraz de inyección, puede comprender múltiples dosis para la vacunación de múltiples sujetos. Cada dosis es preferiblemente de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 1 ml, preferiblemente cada dosis es de aproximadamente 0,3-0,5 ml, lo más preferiblemente de aproximadamente 0,3 ml. Las dosis pueden estar comprendidas en el recipiente en forma concentrada o liofilizada, y pueden diluirse o reconstituirse con un fluido de inyección adecuado antes de la administración.

La administración es preferiblemente intramuscular. La administración preferiblemente no es intravascular, subcutánea o intradérmica. Las composiciones de vacuna propuestas en esta invención demuestran su superioridad en comparación con una composición de vacuna que contiene el RBD adyuvado, no conjugado; Hay varias características de estas composiciones de vacuna que son cruciales en las circunstancias actuales de la pandemia, a saber, la rapidez de la respuesta provocada y los altos niveles de títulos de anticuerpos que actúan como neutralizadores del virus SARS-CoV-2 y bloqueadores de la interacción del receptor RBD-ACE2. Estas composiciones provocan una respuesta inmune de patrón Th1 así como una respuesta de memoria de células CD8 +, CD4 + y T específicas para el RBD, en particular aquellas que producen IFNγ.

Ventajas adicionales

Las composiciones de vacuna propuestas en esta invención demuestran resultados superiores con ensayos clínicos en la población pediátrica.

Además, las composiciones de vacuna propuestas en esta invención demuestran una respuesta de IgG mucosal en humanos vacunados. La importancia de esto es que tal respuesta mucosa inducida redujo la transmisión del virus así como su infectividad. El presente inventor considera que esta es una propiedad única y nueva entre las vacunas Covid-19 actualmente disponibles.

Se considera que la estructura RBD propuesta actualmente como parte de la vacuna de proteína Spike completa tiene ventajas importantes, ya que la vacuna de proteína Spike completa muestra eventos adversos importantes como miocarditis y pericarditis. Estos efectos secundarios están relacionados con la región carboxilo de la proteína Spike. Esta región no está presente en las vacunas conjugadas de proteína portadora RBD propuestas actualmente. Es de destacar que la

composición de vacuna propuesta actualmente es muy adecuada para uso pediátrico, ya que los efectos secundarios referidos de las vacunas de proteína Spike completas son particularmente drásticos en la población pediátrica.

Los resultados iniciales muestran que la respuesta inmune de sujetos inmunodeprimidos e inmunodeprimidos es altamente beneficiosa y mejor que con otras vacunas.

Los presentes inventores no han identificado otros eventos adversos, como se informa para las vacunas virales inactivadas o las vacunas de vectores de adenovirus, y la evaluación de la respuesta inmune o la respuesta de anticuerpos neutralizantes es mayor que para las vacunas virales inactivadas.

10

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Preparación del RBD (319-541) activado por la cisteína 538 a partir del dímero.

El dímero de RBD (secuencia 319-541) se disuelve en tampón PBS 35 mM pH 7,4 con 0,5 mM de EDTA, para lograr una concentración final entre 5-10 mg/mL de proteína. Se adiciona una disolución de TCEP para completar una concentración final entre 125 μ M- 420 μ M. La reacción se deja transcurrir durante 10 min en atmósfera de argón con agitación moderada a temperatura ambiente.

La conversión en monómero se verifica por HPSEC y la integridad molecular por electroforesis en gel de poliacrilamida. En la figura 6 se muestran los perfiles en HPSEC donde se observa que el monómero generado por reducción tiene la misma distribución molecular que el monómero nativo. En la figura 7 (SDS-PAGE) se puede observar que el RBD monómero regenerado por reducción (línea 3) tiene igual patrón de migración que el RBD monómero nativo (línea 2, conformación nativa). A diferencia de una muestra control a la que se aplicaron condiciones drásticas para reducir los puentes inter e intramoleculares (línea 4), que migra menos.

La conservación de la Antigenicidad del monómero generado luego de la reducción se realiza mediante un ELISA indirecto utilizando un suero humano de convaleciente de COVID-19. Como se observa en la Figura 8, se comprueba que el RBD regenerado por reducción, fue reconocido de manera similar que el RBD nativo en este sistema mientras que el control de monómero de RBD reducido en condiciones drásticas, que rompen los puentes bisulfuro inter e intramoleculares (Total (C-)) no es reconocido por el suero.

Ejemplo 2. Preparación del conjugado del RBD (secuencia 319-541) a Toxoide tetánico

Funcionalización de la proteína portadora: La proteína portadora toxoide tetánico en disolución tampón a HEPES 100 mM pH 7,8 a una concentración de 5mg/mL se pone a reaccionar con éster N-hidroxisuccinimídico del ácido maleimidopropiónico (EMP) en DMSO (75 mg/mL) goteando este último lentamente. La reacción se mantiene durante una hora a temperatura ambiente. La purificación se realiza por diafiltración realizando lavados con disolución tampón PBS 35mM pH 7,4 con 5mM de EDTA. La extensión de la funcionalización se determina por el método de ELLMAN modificado.

Conjugación: A una disolución del RBD en su forma monomérica o regenerado por reducción *in situ* del RBD dimerico a monómero, se adiciona el toxoide tetánico previamente funcionalizado, en una relación RBD:TT (m:m) entre 0,2-4,0. La reacción se mantiene con agitación suave entre 4-18 h a 5 ± 3 °C en atmósfera de argón. Para bloquear los grupos maleimidos remanentes se adiciona hidrocloreuro de cisteamina hasta una concentración de 157 uM y se mantiene la agitación durante 30 min. Transcurrido este tiempo el conjugado se purifica.

Purificación: Se realiza por diafiltración con membrana de 100 kDa como valor de corte, realizando lavados con PBS 6 mM pH 7,0.

La relación RBD / TT se determinó mediante una combinación de densitometría de transferencia puntual y colorimetría. El contenido de RBD no conjugado y la distribución del tamaño molecular se determinaron mediante HPSEC. El tamaño molecular y el índice de polidispersión se determinaron mediante Dynamic Light Scattering (DLS). La tabla 1 muestra que la relación molar de los conjugados varía entre 1,8 y 6,3 moles de RBD / mol de TT, mientras que el contenido de RBD no unido es inferior al 15%. La constante de distribución de tamaño molecular (Kd) demuestra un aumento en el tamaño molecular de los conjugados en comparación con el toxoide tetánico (Kd = 0,31). También se muestra que el tamaño relativo de la población de conjugado aumenta a medida que se incorporan más moles de RBD en la proteína transportadora (Tabla 1 y Figura 9).

Tabla 1. Caracterización químico-física de conjugados RBD-TT

RBD-TT	RBD monómero conjugado	Relación (n:n) RBD/TT	KD	Tamaño Molecular (nm)	Índice de polidispersidad	RBD no enlazado
RBD-TT 1	monómero	1,8	0,28	-	-	0 %
RBD-TT 2	monómero red*	2,1	0,27	13.02	0.262	0 %

RBD-TT 3	monómero	6,3	0,22	23.10	0.273	10,1 %
RBD-TT 4	monómero reducido	9.5	0.19	25.32	0.294	5%
RBD-TT 5	monómero reducido	13.7	0.14	-	-	6%
TT-TT	-	-	0.31	8.75	0.192	-

*monómero regenerado por reducción "*in situ*" del dímero de RBD.

Ejemplo 3. Demostración de la no afectación del reconocimiento del conjugado RBD (319-541)-Toxoide Tetánico por el receptor ACE2 y anticuerpos específicos.

El reconocimiento del RBD conjugado a toxoide tetánico (RBD-TT) por el receptor ACE2 se realiza mediante un ELISA en el cual se recubre la placa con el receptor ACE2 recombinante. Las muestras (RBD-TT (lotes 1 y 2), RBD dimérico como control positivo y hPDLHys como control negativo) se adicionan a diferentes concentraciones (0.001; 0.004; 0.019; 0.078; 0.3125; 1.25 y 5 µg/ml) y luego de incubadas se adiciona un suero policlonal de conejo específico a RBD. Posteriormente, se adiciona una IgG anti- conejo conjugada a peroxidasa. La reacción es revelada con el sustrato correspondiente y leída a una Abs de 405 nm).

Como se observa en la figura 10A, los dos lotes de conjugado son reconocidos por el receptor ACE2 al igual que el control positivo RBD dimérico. Se comprueba, por tanto, que los procesos de reducción *in situ* y conjugación, no afectan los epítomos del RBD responsables del reconocimiento del mismo al receptor ACE2.

La antigenicidad del RBD-TT se comprueba además por Dot Blot utilizando un suero IgG policlonal específico anti-RBD. En la Figura 10B, se observa que el conjugado es reconocido fuertemente por los anticuerpos específicos anti-RBD en todas las diluciones evaluadas, mientras que el toxoide tetánico (TT) aplicado a una dilución 1/80 no es reconocido. Se demuestra que la conjugación no afecta el reconocimiento de los anticuerpos al RBD.

Ejemplo 4. El conjugado RBD (319-541)-TT induce una potente respuesta de anticuerpos en ratones BALB/c.

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

- Grupo 1:1 µg de RBD-(319-541)-TT.
- Grupo 2:1 µg de RBD-(319-541)-TT co-adsorbido en 500 µg de Al(OH)₃.
- Grupo 3:3 µg de RBD-(319-541)-TT.

- Grupo 4: 3 µg de RBD-(319-541)-TT co-adsorbido en 500 µg de Al(OH)₃.
- Grupo 5: 3 µg de RBD-(319-541) co-adsorbido en 500 µg de Al(OH)₃.
- Grupo 6: Placebo. PBS y 500 µg de Al(OH)₃

El grupo 6 constituye la formulación control negativa.

- 5 Se realiza la extracción de sangre a tiempos 7, 14, 21 y 28 días después de iniciada 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 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
- 10 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 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
- 15 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 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
- 20 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 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
- 25 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 de 1.4.

- En la figura 11 muestra que la respuesta IgG inducida por la inmunización con RBD-TT 3 µg adyuvado en Al(OH)₃ induce una respuesta de anticuerpos temprana (7 y 14 días)
- 30 significativamente mayor (p< 0,05) comparado con la misma dosis de RBD sin conjugar y adyuvado también en Al(OH)₃. Esta propiedad es atribuible a la conjugación del RBD a una proteína portadora. De igual modo, se observa que RBD-TT 1 µg adyuvado en Al(OH)₃ induce una cinética de anticuerpos similar a 3 µg de RBD sin conjugar, lo que demuestra que la conjugación permite incrementar la respuesta al antígeno a más baja dosis.

Adicionalmente, se observa un incremento de los niveles de anticuerpos anti-RBD inducido por las formulaciones conjugadas adyuvadas respecto a las no adyuvadas, para la misma dosis.

Ejemplo 5. Título de anticuerpos anti-Toxoide tetánico inducidos por el conjugado RBD (319-541)-Toxoide Tetánico

- 5 Para evaluar la inducción de anticuerpos anti-TT inducidos por los conjugados RBD-TT se utilizaron los sueros provenientes de los ratones inmunizados según el procedimiento descrito en el ejemplo 4 extraídos a tiempo 7, 14, 21 y 28 días. Las placas de microtitulación de 96 pocillos NUNC Maxisorp se recubrieron con 100 μ L de toxoide tetánico a una concentración de 2.5 μ g/mL en PBS 1X pH 7.2 y se incubaron toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Luego se lavaron tres
- 10 veces con disolución de lavado. Posteriormente, se adicionaron los sueros y la curva disueltos en disolución reguladora de fosfatos pH 7.2 + BSA al 1% en diferentes diluciones y se aplicaron 100 μ L/pozo. Las placas se incubaron 1 hora a 37°C y fueron lavadas nuevamente. A continuación, se adicionaron 100 μ L de una dilución de anti-inmunoglobulina G de ratón conjugada a peroxidasa en disolución reguladora de fosfatos pH 7.2 + BSA al 1% (1:10000)
- 15 durante 1 hora a 37°C. Luego de un último paso de lavado, se aplicó 100 μ L/pozo de la disolución sustrato para enzima peroxidasa. Se incubó en la oscuridad durante 25 minutos y se detuvo la reacción con disolución de H_2SO_4 2N 50 μ L/pozo. Se leyó la absorbancia a 450 nm en un lector de ELISA Multiskan EX (Thermo Scientific). El título se determinó transformando los valores de absorbancias a UI/mL (Unidades Internacionales por mililitro); se utilizó la función logistic-log de
- 20 cuatro parámetros para construir la curva de referencia a partir de las diluciones del estándar. Como se observa en la Figura 12, las formulaciones que contenían el conjugado adyuvado en $\text{Al}(\text{OH})_3$ indujeron una elevada respuesta de IgG anti-TT, superior significativamente ($p < 0,05$) a los grupos sin adyugar.

- Ejemplo 6. Actividad funcional de los anticuerpos anti-RBD inducidos por la formulación del conjugado RBD (319-541)-Toxoide Tetánico mediante Ensayo de Inhibición de la interacción de RBD-ACE2.**
- 25

Los sueros provenientes de los ratones inmunizados según el procedimiento descrito en el ejemplo 4 extraídos a tiempo 28 se emplearon en un ELISA para determinar su capacidad de inhibición de la interacción del RBD y ACE2.

- 30 Se realizó un ELISA de inhibición de la interacción del RBD al ACE2 inducido por los anticuerpos anti-RBD. Para la determinación del % de inhibición de la interacción RBD-ACE2, las placas recubiertas con ACE2-Fc de ratón (5 μ g/mL), se bloquearon y se les añadió la mezcla RBD-Fc humano con suero de ratones inmunizados con las diferentes formulaciones experimentales, a

- diluciones desde 1:25 a 1:10000, que habían sido previamente incubados 1h a 37°C. Para la detección del reconocimiento se utilizó un conjugado anti human IgG (gamma chain specific)-fosfatasa alcalina, diluido en tampón SSTF-T-leche al 0.2%. Luego de un último paso de lavado, se aplicó 50 µL/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 µL/pozo. Se leyó la absorbancia a 405 nm. 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 concentración máxima inhibitoria 50 (IC50) por regresión no-lineal utilizando el programa GraphPad 7.00 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).
- La figura 13 muestra la capacidad inhibitoria del suero de los ratones inmunizados con la formulación objeto de la presente invención. Se observa que los anticuerpos inducidos por las formulaciones RBD-TT adyuvadas tienen mayor capacidad inhibitoria que los anticuerpos inducidos por las formulaciones no adyuvadas. Por otra parte, la capacidad inhibitoria 50 de las formulaciones conjugadas adyuvadas es 2 (RBD-TT 1 µg /Al(OH)₃) y 6.5 (RBD-TT 3 µg /Al(OH)₃) veces superior a la de la formulación RBD 3 µg/Al(OH)₃ sin conjugar, demostrando que la conjugación del RBD incrementa la funcionalidad de los anticuerpos incluso utilizando dosis inferiores.

Ejemplo 7. Actividad funcional de los anticuerpos anti-RBD inducidos por la formulación del conjugado RBD (319-541)-Toxoide Tetánico mediante 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 con RBD-TT 3 µg /Al(OH)₃ y RBD 3 µg/Al(OH)₃ luego de 28 días de la primera dosis (Ejemplo 4) 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.

En la Figura 14 se observa que los títulos de anticuerpos neutralizantes inducidos por el conjugado RBD-TT son significativamente superiores ($p < 0,01$) a los inducidos por el RBD sin
5 conjuguar, demostrando la superioridad de la conjugación del RBD aumentando la funcionalidad de los anticuerpos inducidos.

Ejemplo 8. Respuesta inmune celular patrón Th1, determinado por la inducción de IFN γ de la formulación con conjugado RBD (319-541)-Toxoide Tetánico.

La evaluación de la respuesta inmune celular se realizó en los ratones inmunizados según el
10 procedimiento descrito en el ejemplo 4 extraídos a tiempo 21. Los esplenocitos fueron aislados de ratones inmunizados con 1ug RBD-TT formulado en Al(OH) $_3$ o Placebo (Al(OH) $_3$) y re-estimulados *in vitro* con RBD (5 μ g/mL), determinado por ELISA cuantitativo. La concentración celular empleada fue de 1×10^6 células/mL. Los niveles de IL-4, IL-17A e IFN- γ fueron
15 determinados en el sobrenadante de cultivo, mediante ELISA cuantitativo a las 72 horas de estimulación.

La figura 15 demuestra que la inmunización con el 1ug RBD-TT/Al(OH) $_3$ induce IFN- γ , demostrándose la polarización de la respuesta de células T a un patrón Th1. No se detectó IL-4 e IL-17A demostrando que el conjugado no polariza hacia un patrón Th2 o Th17.

Ejemplo 9. Respuesta de células T de memoria, específicas por la proteína RBD del SARS-CoV-2 inducida por la formulación con conjugado RBD (319-541)-Toxoide Tetánico
20

La evaluación de la respuesta de células T de memoria se realizó en los ratones inmunizados según el procedimiento descrito en el ejemplo 4 extraídos a tiempo 21. Los esplenocitos fueron
aislados de ratones inmunizados con 1ug RBD-TT formulado en Al(OH) $_3$ o Placebo (Al(OH) $_3$). Los esplenocitos fueron cultivados en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal
25 bovino (vol/vol), 100U penicilina, 100 μ g/mL de estreptomycin, 1mM de piruvato, 50 μ M β -mercaptoethanol, 20 U/mL IL-2 (Sigma-Aldrich) por 72 horas. Al mismo tiempo, 5 μ g/ml del RBD fue añadido para activar las células. Brefeldina A (BD Biosciences) fue administrada de 4-6 horas antes del marcaje para bloquear la secreción de citoquinas. Las células fueron entonces lavadas
por PBS 1X (Gibco) y teñidas por 30 min a 4 C con anti- CD8, anti-CD4, anti CD44 y anti-CD220
30 (BioLegend). Posteriormente, las células fueron fijadas y permeabilizadas para facilitar la tinción intracelular con anti-IFN- γ y anti-IL-4 (BioLegend). Los datos de citometría fueron adquiridos en

el citómetro de flujo Gallios (Beckman Coulter), los resultados se procesaron con el software Kaluza (Beckman Coulter).

La figura 16 muestra que la inmunización con el 1ug RBD-TT /Al(OH)₃ genera linfocitos T CD8⁺ (A) y T CD4⁺ (C) de memoria, RBD específicos, con fenotipo CD44⁺⁺. Además, produjo un
5 incremento de la frecuencia de células T CD8 (B) y T CD4 (D) de memoria productoras de IFN-
Y.

Ejemplo 10. Preparación del RBD (328-533) tiolado en el residuo N-terminal

Una disolución del RBD (328-533), concentración final 20-200 µM en 5-10 mL de disolución
tampón fosfato 50 mM (pH 7,5) en presencia de EDTA 5 mM se trata con el reactivo 2-tioacetyl-
10 piridino-2-carbaldehído (1-10 mM concentración final). La mezcla de reacción se agita a
temperatura entre 23-37 °C durante un periodo que oscila entre 12 h y 48 h. La purificación se
realiza por diafiltración realizando lavados con disolución tampón PBS 35 mM pH 7,4 con 5 mM
de EDTA. El RBD (328-533) funcionalizado se lleva a concentración final de 20-200 µM y se trata
con hidrócloruro de hidroxilamina hasta una concentración final de 40 mM. La mezcla de reacción
15 se agita a temperatura ambiente en atmósfera nitrógeno por un periodo entre 1-5 h, y el grado
de conversión se determina por el ensayo de Ellman (>90% conversión obtenido).

Por espectrometría de masa se verifica una conversión superior al 80% del residuo N-terminal.
La evaluación por HPSEC evidencia que no hubo fenómenos de agregación durante la reacción,
el RBD mantiene su distribución de talla molecular, una vez tiolado (Figura 17).

20 Ejemplo 11. Preparación del conjugado RBD (328-533) tiolado por el N-terminal a toxoide tetánico

La obtención del conjugado RBD (328-533) tiolado por el N-terminal a toxoide tetánico se realiza
como se describe en el ejemplo 2.

En la figura 18A se muestra una superposición de los cromatogramas en HPSEC Superdex 75
25 del RBD, la mezcla de reacción de conjugación de 16 h y el conjugado purificado. El conjugado
purificado tiene una relación molar RBD/TT de 1.9, con un contenido de RBD no enlazado menor
del 15 %. El perfil cromatográfico en HPSEC Superdex 200 (figura 18B), muestra un incremento
en la talla molecular del conjugado (K_d=0,27) respecto a la proteína portadora (K_d=0,31).

Los conjugados obtenidos a partir de las SEQ ID NO. 1 y NO. 3, por el procedimiento de
30 conjugación descrito en el ejemplo 2, tienen similares características químico físicas.

Ejemplo 12. Demostración de la no afectación del reconocimiento del conjugado RBD (328-533) a Toxoide Tetánico por el receptor ACE2 y anticuerpos específicos.

El reconocimiento del RBD conjugado a toxoide tetánico por el receptor ACE2 y a anticuerpos específicos anti-RBD se analiza cómo se describe en el ejemplo 3.

- 5 En la figura 19A se observa, que el conjugado es reconocido por el receptor ACE2 al igual que el control positivo RBD. Se comprueba, por tanto, que los procesos de tiolación por el residuo N-terminal y la conjugación, no afectan los epítomos del RBD responsables del reconocimiento del mismo al receptor ACE2.

- 10 La antigenicidad del conjugado se comprueba además por Dot Blot utilizando un suero IgG policlonal específico anti-RBD. En la Figura 19B, se observa que el conjugado es reconocido fuertemente por los anticuerpos específicos anti-RBD en todas las diluciones evaluadas, mientras que el toxoide tetánico (TT) aplicado a una dilución 1/80 no es reconocido. Se demuestra que la conjugación no afecta el reconocimiento de los anticuerpos al RBD.

- 15 **Ejemplo 13. El conjugado RBD (319-541) -TT provoca una fuerte respuesta de anticuerpos en humanos, especialmente en población pediátrica.**

La formulación de la vacuna que incluye RBD- (319-541) -TT en alumbre se evaluó en ensayos clínicos en un programa de dos dosis (T0, T28 días). Los procedimientos de los ensayos clínicos en población adulta (Fase II, 19-80 años) y pediátrica (Fase I / II, 3-18 años) se describen en:

<https://rpcec.sld.cu/ensayos/RPCEC00000347>, <https://rpcec.sld.cu/ensayos/RPCEC00000374>

- 20 La Figura 20 muestra los resultados de IgG anti-RBD específica en suero 14 días después de la segunda dosis en ambos ensayos clínicos. Se elevaron niveles elevados de anticuerpos en todos los grupos de edad con un 74% de seroconversión en la población adulta (19-80 años). En particular, los niños alcanzaron el 92,8% y el 99,3% de seroconversión en los grupos de 12-18 años y 3-11 años, respectivamente. Además, las medianas de ambos grupos pediátricos: 50,3
25 (15,9; 62,0 en 12-18 años) y 99,8 (39,1; 216,8 en 3-11 años) fueron superiores a la mediana de un panel de suero elaborado con COVID-19. niños convalecientes: 8,7 (3,4; 15,7).

Ejemplo 14. El conjugado RBD (319-541) -TT induce IgG mucosa específica en humanos

Saliva de sujetos inmunizados con dos dosis (T0, 28 días) de una formulación de RBD- (319-541) -TT en alumbre y una dosis de refuerzo de RBD dimérico en alumbre (T56) como se describe:

- 30 <https://rpcec.sld.cu/ensayos/RPCEC00000360>

se analizó mediante un ensayo ELISA "interno". RBD como revestimiento (5 µg / ml) y PBS-BSA al 3% como bloqueo. Las muestras de saliva se evaluaron puras por duplicadas. Después de las etapas de incubación, se añadió el conjugado humano de peroxidasa anti-IgG (Sigma A6029, 1: 2500) en un tampón apropiado. La reacción fluorimétrica final se indujo añadiendo sustrato OPD.

- 5 Los resultados se expresaron en valores de absorbancia.

La Figura 16 muestra que los sujetos que fueron inmunizados provocaron una respuesta IgG anti-RBD específica en la saliva.

CONJUGADOS COVALENTES DEL DOMINIO DE UNIÓN AL RECEPTOR DEL VIRUS SARS-COV-2 Y UNA PROTEÍNA PORTADORA Y LAS COMPOSICIONES VACUNALES QUE LOS CONTIENEN.

5

REIVINDICACIONES

1. El conjugado covalente que comprenden el dominio de unión al receptor (RBD) del SARS-CoV-2 y una proteína portadora.
2. El conjugado covalente de la reivindicación 1 donde la proteína portadora se selecciona del grupo que comprende: el toxoide tetánico, el toxoide diftérico y CRM197.
- 10 3. El conjugado covalente de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde la relación RBD/proteína portadora se encuentra en el rango molar: entre 1-8 unidades de RBD por 1 proteína portadora.
4. El conjugado covalente según las reivindicaciones 1-3, donde el RBD se selecciona del grupo que comprende las SEQ ID NO. 1-3.
- 15 5. El conjugado covalente según las reivindicaciones 1-4 donde el RBD que tiene la SEQ ID NO.1 se encuentra en forma de dímero.
6. El conjugado covalente de las reivindicaciones 1-5 donde el RBD es producido en los hospederos que se seleccionan del grupo que comprenden: células de mamíferos, células de insectos, bacterias y levaduras.
- 20 7. Una composición vacunal para inducir una respuesta inmune contra el virus SARS-CoV-2 caracterizada porque comprende el conjugado covalente de las reivindicaciones 1-5.
8. La composición vacunal de la reivindicación 7 que adicionalmente comprende un adyuvante que se selecciona del grupo que comprende: hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y fosfato cálcico.
- 25 9. La composición vacunal de la reivindicación 7 donde el conjugado se encuentra en el rango de concentración de 1-30 µg por dosis en función del RBD.
10. La composición vacunal de la reivindicación 8 donde el adyuvante se encuentra en el rango de concentración de 200-1500 µg por dosis.
11. La composición vacunal según la reivindicación 7-10, que además comprende
- 30 excipientes farmacéuticamente adecuados.
12. Un procedimiento para la preparación del conjugado covalente de las reivindicaciones 1-5 que comprende las siguientes etapas: A) Funcionalización de la proteína portadora para

introducirle grupos tiofilicos, B) Conjugación covalente de proteína portadora al RBD y C) Purificación.

13. El procedimiento según la reivindicación 12 que adicionalmente comprende un paso de Reducción in situ de la forma RBD-dimérico previo a la etapa A.
- 5 14. El procedimiento según la reivindicación 12 que adicionalmente comprende un paso de Tiolación del extremo N-terminal del RBD previo a la etapa A.
15. El procedimiento según la reivindicación 13 donde se emplea la SEQ ID NO. 1.
16. El procedimiento según la reivindicación 14 donde se emplea cualquiera de las SEQ ID NO. 1-3.
- 10 17. El procedimiento según la reivindicación 12 donde en la etapa A, los grupos tiofilicos que se introducen se seleccionan del grupo que comprende: maleimidos, bromoacetilo, vinilsulfonas, acrilatos, acrilamidas, acrilonitrilos y metaacrilatos.
18. El conjugado obtenido según el procedimiento de la reivindicaciones 12-17.
19. Uso de la composición vacunal de cualquiera de las reivindicaciones 7-11 en la
15 prevención de la infección por el virus SARS-CoV-2.
20. Uso de la composición vacunal de cualquiera de las reivindicaciones 7-11 en la prevención de la infección por el virus SARS-CoV-2 cuando se requiere de una respuesta de anticuerpos neutralizantes después de dos dosis de la composición vacunal.
21. Uso de la composición vacunal de cualquiera de las reivindicaciones 7-11 en la inducción
20 de una respuesta de anticuerpos contra el virus SARS-CoV-2 por vía intramuscular en dosis de RBD de entre 1-30 µg, en esquema de inmunización de 1 a 3 dosis.

