USO DE COMPOSICIONES VACUNALES BASADAS EN EL DOMINIO DE UNIÓN AL RECEPTOR DEL VIRUS SARS-COV-2 EN EL DESARROLLO DE UNA INMUNIDAD PROTECTORA

CAMPO DE LA TÉCNICA

La presente invención se relaciona con la Biotecnología y la Medicina. Particularmente, con el uso de composiciones vacunales basadas en el Dominio de Unión al Receptor del virus SARS-COV-2 en el tratamiento de pacientes recuperados de COVID19 y en aquellos sujetos vacunados donde no se desarrolla una inmunidad protectora, en los que ha disminuido o no se indujo una significativa respuesta natural protectora de anticuerpos.

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:180 281–292). Este dominio RBD de la proteína S o también conocida como *Spike* del virus SARS-CoV-2, es un fragmento de aproximadamente 195 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 respectivamente lo que genera una estructura muy compacta y estable (Lan y cols (2020), Nature https://doi.org/10.1038/s41586-020-2180-5).

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 en las asparaginas N331 y N343 (Chen, WH y cols (2017) Journal of Pharmaceutical Sciences 106: 1961-1970).

Las estrategias de las vacunas han pasado desde utilizar el virus inactivado, pasando por construcciones genéticas que contienen el material genético del virus incorporado ya sea en adenovirus o como ARN mensajero, hasta vacunas de subunidades obtenidas por biología molecular en hospederos. Las moléculas preferidas para este fin son la proteína S, o un fragmento de su estructura: el RBD.

La utilización de estas moléculas tiene como ventaja principal su seguridad pues las mismas se acercan más al campo de las vacunas evaluadas hasta ahora, al mismo tiempo el reto fundamental de estas estrategias es lograr inducir una respuesta inmune suficiente para proteger de la infección viral.

Hasta el 2 de diciembre de 2020 estaban declarados en evaluación preclínica 163 candidatos vacunales contra el SARS-CoV-2 y 51 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 –2 de diciembre 2020, disponible en: https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines*).

A varios meses de iniciada la pandemia, se empieza a conocer mejor los impactos en el sistema inmune de los pacientes que han padecido el COVID19. La enfermedad, en especial en sus estadios graves y críticos cursa con un fuerte componente híper-inflamatorio desencadenando una tormenta de citoquinas (de la Rica, R; Borges M; Gonzalez-Freire, M (2020) Front. Immunol. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.558898; Riva y cols. (2020) Critical Care. 24:549), el cual puede llegar a contribuir con la letalidad, si no se controla de forma apropiada (Tisoncik, J y cols. (2012) Microbiology and Molecular Biology. 76(1):16-32). De hecho, varios medicamentos están siendo desarrollados con tal fin, algunos de los cuales se empiezan a introducir en los protocolos médicos de actuación en Cuba (Martínez y cols. (2020) Anales de la Academia de Ciencias de Cuba. 10(2) http://www.revistaccuba.sld.cu Consultado el 2 de diciembre de 2020) y en el mundo (Xu, X y cols. (2020) Military Medical Research. 7:22).

Por otra parte, varios estudios demuestran la aparición natural de anticuerpos anti-RBD, que son neutralizantes del SARS-CoV-2, en pacientes que se han recuperado de la enfermedad (convalecientes). Los niveles de anticuerpos resultan ser variables entre los individuos, apreciándose cierta correlación entre los títulos alcanzados y la severidad de la enfermedad sufrida (menor en asintomáticos, que en pacientes con enfermedad modera, grave o crítica) (Seow, J y cols. (2020) Nature Microbiology doi: 10.1038/s41564-020-00813-8; Bošnjak, B y cols. (2020) Cell Mol Immunol. doi: 10.1038/s41423-020-00573-9). También se ha documentado que existe una correlación entre el título de anticuerpos anti-RBD en los convalecientes que correlaciona muy bien con la capacidad de neutralizar la infección viral por SARS-CoV-2 de células *in vitro* (Tan, C y cols. (2020) Nature Biotechnology https://doi.org/10.1038/s41587-020-0631-z).

No obstante, todo lo anterior, los estudios recientes han demostrado que el título de anticuerpos anti-RBD y su capacidad neutralizante del SARS-CoV-2, se reduce progresivamente en los individuos recuperados de la infección (Lee, W y cols. (2020) The Journal of Infectious Diseases, DOI: 10.1093/infdis/jiaa673). Adicionalmente, comienzan a parecer más y más evidencias en la literatura de reinfección de pacientes, con casos donde la segunda infección ha sido incluso más severa que la primera (Qu, YM y Cong HY (2020) Travel Med Infect Dis. 34:101619; Lan L y cols. (2020) JAM. 323:1502-3; Tillett, R y cols. (2020) Lancet Infect Dis. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30764-7). Estos datos han llamado la atención a la comunidad científica internacional sobre la necesidad de estudiar mejor estos pacientes y desarrollar estrategias para garantizar su efectiva protección (Overbaugh, J (2020) Nature, 26 1678–1685).

Dado que el sistema inmune de los pacientes que sufrieron el SARS-CoV-2 ha tenido un encuentro previo con los antígenos virales, en un contexto inmunológico muy particular (*sui-generis*), no resulta evidente que las vacunas o estrategias vacunales que se han desarrollado para la población general (individuos que no se han puesto en contacto con el virus); sean apropiadas o eficaces en generar o potenciar la protección a reinfección, sin generar efectos adversos indeseados como por ejemplo una reactivación de la tormenta de citocinas o la estimulación de anticuerpos que causen el fenómeno conocido como ADE (del inglés *antibody denpendend enhancement*) de la infección viral (Arvin, AM y cols. (2020) Nature 584(7821):353-363). Adicionalmente, no se conoce la duración de la protección inducida por las diferentes tecnologías de vacunas que se evalúan hoy en el mundo, y que de ser necesaria una dosis de refuerzo, algunas de esas vacunas no podrían ser utilizadas como refuerzo.

La presente invención describe por primera vez, el uso de composiciones vacunales basadas en el dominio de unión al receptor del virus SARS-CoV-2, en el tratamiento de pacientes recuperados de COVID19 en los que se ha producido una disminución o no se indujo una significativa respuesta natural protectora de anticuerpos. Adicionalmente, pueden ser utilizadas en individuos previamente vacunados con una tecnología vacunal tipo adenovirus o RNA. Las composiciones vacunales descritas, están siendo también ensayadas en individuos no infectados, pero muestran ahora por primera vez su capacidad de re-estimular eficientemente en pacientes convalecientes una fuerte respuesta inmune con capacidad neutralizante. El hecho de que ambas estrategias vacunales se basan en una proteína recombinante pequeña del virus SARS-CoV-2, el RBD, puede dar ventajas particulares en este campo de aplicación. En particular, se amplifica/potencia una respuesta muy dirigida contra el RBM, que determina la interacción natural del virus con el receptor ACE2 en las células del huésped. Estimular mayoritariamente esta repuesta protectora, con un buen perfil de seguridad, es una ventaja al comparar con otras estrategias vacunales como las vacunas de virus atenuados, las basadas en toda la proteína S o las basadas en vectores virales.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

En una realización la presente invención se relaciona con el uso de composiciones vacunales que comprenden el dominio de unión al receptor (RBD) del virus SARS-CoV-2 en el tratamiento de pacientes recuperados de COVID19. Particularmente dichos pacientes recuperados tienen una inmunidad humoral caracterizada por al menos una de las siguientes condiciones: título de respuesta contra el RBD inferiores a 1/1000, capacidad de inhibición de la interacción RBD-proteína ACE2 inferior al 50% en una dilución 1/100 o título de anticuerpos neutralizantes del SARS-CoV-2 por debajo de 1/160.

En una realización particular, la presente invención se relaciona con el uso anteriormente referido de composiciones vacunales que se caracterizan porque comprenden un conjugado covalente entre el RBD y una proteína portadora que se selecciona del grupo que comprende: el toxoide tetánico, el toxoide diftérico y CRM197. Otras composiciones vacunales utilizadas en el uso reclamado en la presente invención son las que comprende como antígeno el RBD ya sea en forma de monómero o dímero absorbido en $AlOH_3$. Otras composiciones vacunales reclamadas comprende en uso de inmunopotenciadores como la vesícula de membrana externa de *Neisseria meningitidis*. En una realización particular las composiciones vacunales anteriores son administradas a los pacientes recuperados de COVID-19 en un esquema de inmunización por vía intramuscular o subcutánea que comprende un rango de dosis entre 1-100 µg de RBD,

en un rango de 1 a 3 inmunizaciones, a intervalos entre 21 a 28 días. Es objeto de la presente invención, el uso según el esquema de inmunización anterior para obtener plasma hiperimmune con alta capacidad neutralizante del SARS-CoV-2.

En otra realización, la presente invención contempla el uso de las composiciones vacunales aquí referidas, en la inmunización de sujetos vacunados con plataformas vacunales diferentes a las vacunas de subunidades y que no hayan desarrollado una inmunidad protectora efectiva o cuando esta haya disminuido en el tiempo y no sea recomendable dar una dosis de refuerzo con la misma vacuna usada en la primoinmunización, como es el caso de las vacunas de Adenovirus, Virus inactivados, Virus atenuados y de mRNA. Una inmunidad protectora efectiva según la presente invención es cuando se cumplen al menos una de las siguientes condiciones: título de respuesta contra el RBD superiores a 1/1000, capacidad de inhibición de la interacción RBD-proteína ACE2 superior al 50% en una dilución 1/100 o título de anticuerpos neutralizantes del SARS-CoV-2 por encima de 1/160.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención describe el uso de composiciones vacunales basadas en el dominio de unión al receptor del virus SARS-CoV-2 en pacientes recuperados (convalecientes) de COVID19, en los que ya no existen niveles significativos de anticuerpos naturales anti-RBD que confieren capacidad neutralizante. Particularmente, estas composiciones vacunales pueden contener formas diméricas y/o monoméricas del RBD absorbidas en $AlOH_3$, con o sin inmunopotenciador, o ser más complejas como las que se describen de forma detallada en las solicitudes de patente CU-2020-0057 y CU-2020-0069, sin limitarse a estas.

Para su uso en pacientes convalecientes de COVID19, se debe verificar que se cumplen al menos una de las siguientes condiciones: título de anticuerpos anti-RBD por debajo de 1/1000 medido por ELISA, o título de anticuerpos neutralizantes de la infectividad del SARS-CoV-2 inferior a 1/160 medido por ensayos que usen el virus vivo o un pseudo virus, o capacidad inhibición de la interacción molecular entre el RBD y la proteína ACE2 inferior al 50% a una dilución de suero de 1/100 medido por un ELISA de competencia. Los preparados vacunales inducen la activación de la respuesta inmune de memoria contra el virus, garantizando la existencia de altos títulos de anticuerpos RBD, mayoritariamente con capacidad neutralizante por varios meses, (6 meses como mínimo). En el caso que los títulos decaigan nuevamente en el paciente, se podrá administrar una dosis de refuerzo adicional para recuperar la protección. Dada la amplia seguridad de los preparados vacunales los mismos podrán administrarse por varios años consecutivos, entre 2-5 años. Además, las composiciones vacunales referidas en

la presente invención, se pueden emplear en la inmunización de sujetos vacunados con plataformas vacunales diferentes a las vacunas de subunidades que no hayan desarrollado una inmunidad protectora efectiva o una vez que la inmunidad disminuya y se requiera una dosis de refuerzo. Está reportado en la literatura que con las plataformas vacunales basadas en vectores de adenovirus solo se puede inmunizar entre 1-2 veces a los sujetos, pues después de la primera inyección el organismo produce anticuerpos contra el propio vector adenoviral que pueden hacer inefectiva la segunda dosis. (Casimiro, DR y cols. (2003) J. Virol., 77: 7663-7668).

Los preparados vacunales son administrados a los pacientes convalecientes en un esquema de inmunización por vía intramuscular o subcutánea que comprende un rango de dosis entre 1-100 µg de RBD preferentemente entre 30-60 µg, en un rango de 1 a 3 inmunizaciones, a intervalos entre 21-28 días.

La presente invención además contempla un método para la obtención de plasma hiperinmune con capacidad neutralizante del virus SARS-CoV-2, con los anticuerpos producidos por los pacientes convalecientes de COVID19 después de la vacunación. El plasma hiperinmune es útil para el tratamiento de pacientes moderados, graves o críticos de COVID19, como ha sido mostrado por múltiples autores (Bloch EM y cols. (2020) J Clin Invest. 130:2757–65, Casadevall A. (2020) JAMA 324:455–7). Para ello, de forma convencional, los donantes deben estar libre de síntomas, ser negativos a la detección del SARS-CoV-2 por PCR en tiempo real y tener un título de anticuerpos neutralizantes de al menos 1/160, de acuerdo a las recomendaciones de la FDA (US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Investigational COVID-19 convalescent plasma: guidance for industry. Rockville, MD: FDA, 2020). El método de la presente invención permite obtener el plasma hiperhinmune de convalecientes que naturalmente no han generado una buena respuesta inmune. Pare ello los convalecientes se inmunizan con el esquema aquí descrito hasta que alcancen los niveles de anticuerpos neutralizantes deseables (títulos >1/160) para la posterior obtención de plasma hiperinmune, útil para la transferencia pasiva de anticuerpos contra el SARS-CoV-2. El plasma para emplear en dicho método será procesado mediante los estándares de procesamiento de la sangre para tales fines.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Correlación entre los títulos de anticuerpos IgG totales detectados contra RBD y los valores de porcentaje de inhibición de los sueros a la dilución 1/100.

Figura 2. A: Valores de porcentaje de inhibición de la interacción RBD-ACE2 de sueros de sujetos seis meses después de recibir esquema de inmunización con vacuna mRNA

y después de aplicada dosis de refuerzo con vacuna de RBD. **B:** Concentración de anticuerpos anti-RBD detectados en sujetos inmunizados con vacuna de virus inactivado que recibieron dosis de refuerzo con vacuna de RBD.

Figura 3. Concentración de anticuerpos anti-RBD detectados en sujetos inmunizados con vacuna de RBD que recibieron dosis de refuerzo con vacuna de RBD conjugado.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Variabilidad de títulos anti-RBD y capacidad de Inhibitoria de la interacción RBD-ACE2 en pacientes cubanos recuperados de la COVID19.

El suero de 39 individuos convalecientes a la COVID-19 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 5 µg/mL en disolución salina tamponada en fosfato (SSTF) pH 7.0, se incubaron 1 hora a 37ºC y al término se bloquearon los sitios no recubiertos empleando 150 µL de una disolución de bloqueo (SSTF, Tween 20 (0,05%) [v:v] y leche descremada al 4%) durante 30 minutos a 37ºC. Luego se adicionaron los sueros disueltos en disolución de bloqueo en diluciones seriadas (1:2), generalmente partiendo de 1/100 y en un volumen de 100 µL/pozo. Las placas se incubaron toda la noche a 4ºC. A continuación, se lavaron tres veces con SSTF, Tween 20 (0,05%) [v:v] y se adicionaron 100 µL de una dilución de anti-inmunoglobulina G de humana conjugada a peroxidasa en solución de bloqueo (1:5000) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego de un último paso de lavado, se aplicó 100 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 H_2SO_4 2N 50 µL/pozo. Se leyó la absorbancia a 490 nm en un lector de ELISA. Para determinar el Título de IgG se realizó una regresión lineal con el rango de diluciones evaluadas y se interpoló utilizando como umbral dos veces el valor de la media de la absorbancia de un suero negativo obtenido previo a la COVID-19 diluido 1/100.

Los sueros provenientes de estos mismos 39 convalecientes se emplearon en un ELISA para determinar su capacidad de inhibición de la interacción del RBD y ACE2. Para la determinación del % de inhibición de la interacción RBD-ACE2, las placas recubiertas con ACE2-Fc de humano (5 µg/mL), se bloquearon y se les añadió la mezcla RBD-Fc de ratón con suero de individuos convalecientes, a diluciones desde 1:100 a 1:10000, que habían sido previamente incubados 1h a 37ºC. Para la detección del reconocimiento se utilizó un conjugado anti IgG de ratón-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 30 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-Abs405nm RBD Fc de ratón + suero de convaleciente/Abs405nm RBD Fc de ratón) *100.

La Figura 1 muestra la capacidad inhibitoria de los sueros de individuos convalescientes, a la dilución de trabajo 1/100 en función del título de anticuerpos contra RBD (n=39). Se observa una correlación positiva (r=0.9178) entre los títulos de anticuerpos totales contra RBD y la capacidad de inhibición de los mismos, r=0.9178. Del total de individuos analizados, el 41% tuvo valores de inhibición inferior al 30% y títulos de anticuerpos anti RBD inferiores a 1/800. La correlación fue analizada por el método de correlación de Spearman

La alta variabilidad observada en los convalecientes cubanos, tanto en los títulos de anticuerpos anti-RBD como en su capacidad de inhibición de la interacción molecular RBD-ACE2 es consistente con lo reportado en la literatura (Tan, C y cols. (2020) Nature Biotechnology https://doi.org/10.1038/s41587-020-0631-z). La literatura avala también que en pacientes convalecientes de COVID19 existe una correlación positiva entre los títulos IgG anti-RBD y la capacidad del suero/plasma de neutralizar la infección por el virus vivo. Solo títulos altos de anticuerpos contra RBD superiores a 1/1350 predicen alta probabilidad (80%) de tener capacidad neutralizante a diluciones de 1/160 (Salazar, E y cols. (2020) bioRxiv. https://doi.org/10.1101/2020.06.08.138990).

Ejemplo 2. Pacientes convalecientes de COVID19 que no muestran inmunidad humoral efectiva logran protección después de la inmunización.

A dos pacientes convalecientes de COVID19 se les realizó extracción de sangre a los 2 y 4 meses respectivamente después de mostrar un resultado negativo de PCR en tiempo real para la detección del SARS-CoV-2. Con la sangre obtenida se obtuvo el suero al que se le realizaron determinaciones para conocer el título de anticuerpos anti-RBD y capacidad de inhibición de la interacción RBD-proteína ACE2 mediante la técnica de ELISA descrita para tales propósitos en el Ejemplo 1 y título de anticuerpos neutralizantes del SARS-CoV-2 mediante un ensayo colorimétrico utilizando Rojo Neutro descrito en la solicitud de patente CU-2020-0069. Las técnicas anteriores se describen en detalle en las solicitudes de patente CU-2020-0057 y CU-2020-0069.

Al comprobar que en ambos casos tanto el título de anticuerpos anti-RBD como el título de anticuerpos neutralizantes se encontraban por debajo de los parámetros establecidos para una respuesta protectora, ambos pacientes se inmunizaron con 50 µg de RBD dimérico absorbido en $AlOH_3$ y transcurridos 14 días de la inmunización se

realizó extracción de sangre y con el suero obtenido se determinó nuevamente el título de anticuerpos anti-RBD y capacidad de inhibición de la interacción RBD-proteína ACE2 y título de anticuerpos neutralizantes del SARS-CoV-2.

La Tabla 1 muestra los resultados de los dos pacientes para las determinaciones realizadas a tiempo 0 (antes de la inmunización) y a los 14 días de inmunizados. Como se puede observar ambos pacientes mostraron después de una sola inmunización altos títulos de anticuerpos anti-RBD, valores de Inhibición de la interacción RBD-proteína ACE2 superiores al 80% y títulos de anticuerpos neutralizantes muy superiores a 1/160. Es importante notar que los títulos neutralizantes aumentan en mayor medida que los títulos anti-RBD, lo que avala que la inmunización aplicada enriquece preferentemente el suero/plasma en anticuerpos con capacidad neutralizante.

Tabla 1. Determinaciones realizadas a pacientes convalecientes de COVID19 antes y después de la inmunización.

	Título anti-RBD			**Capacidad de Inhibición de la interacción RBD-proteína ACE2**		**Título de anticuerpos neutralizantes**		
Tiempo	T0	T14	Crece	T0	T14	T0	T14	Crece
Sujeto 1	1/800	1/12800	x16	48%	95%	1/54	1/2560	x47
Sujeto 2	1/400	1/3200	x8	35%	96%	1/40	1/3162	x79

Es también importante resaltar que en ambos individuos se observó un buen perfil de seguridad al tratamiento. No se observaron eventos adversos significativos.

Ejemplo 3. Incremento de la concentración de anticuerpos anti-RBD y capacidad Inhibitoria de la interacción RBD-ACE2 en sujetos previamente inmunizados con vacuna inactivada y mRNA que reciben dosis de refuerzo con composición vacunal que comprende RBD.

A sujetos que recibieron esquema completo de dos dosis de la vacuna de virus inactivado o mRNA se les realizó extracción de sangre seis meses después para evaluar la duración de la respuesta generada por la primo vacunación. Estos sujetos recibieron una dosis de composiciones vacunales basadas en el RBD del virus SARS-CoV-2 y se evaluó la concentración de anticuerpos anti-RBD y la capacidad inhibitoria de la interacción RBD-proteína ACE2 entre 14 y 28 días después de la dosis de refuerzo.

La Figura 2 muestra la capacidad inhibitoria de los sueros de individuos vacunados con vacuna de mRNA y que recibieron una dosis de refuerzo de una composición vacunal que contiene el RBD con vesícula de membrana externa de *Neisseria meningitidis* adsorbido en $AlOH_3$ (Fig. 2A). Como se puede observar, después de seis meses de recibir el esquema completo, los valores de inhibición se encuentran por debajo de 65%, y después de la inmunización con la dosis de refuerzo esos valores se incrementan por encima de 90% para todos los sujetos evaluados.

Un incremento similar se observa al aplicar una composición vacunal que contiene el RBD adsorbido en $AlOH_3$ en sujetos previamente inmunizados con dos dosis de vacuna de virus inactivado. Los sueros se evaluaron 21 días después de aplicado el esquema completo de la vacuna de virus inactivado y se observaron valores de concentración de anticuerpos anti-RBD con una media en 40 UA/mL que aumentaron a más de 200 UA/mL después de aplicar la dosis de refuerzo.

En ambos casos se demostró la capacidad de reforzar la inmunidad prexistente al aplicar una dosis en sujetos previamente vacunados.

Ejemplo 4. Incremento de la concentración de anticuerpos anti-RBD en sujetos previamente inmunizados con vacuna de RBD, que reciben dosis de refuerzo con composición vacunal que comprende RBD conjugado a toxoide tetánico.

Sujetos inmunizados con dos dosis de un candidato vacunal basado RBD recibieron a los 6 meses una dosis de refuerzo de una composición vacunal que comprende un conjugado covalente entre el RBD y el toxoide tetánico como proteína portadora. Como se puede observar en la figura 3, todos los sujetos mostraron incremento en los valores de concentración de anticuerpos después de aplicada una dosis de refuerzo con la composición vacunal que contiene el RBD conjugado.

USO DE COMPOSICIONES VACUNALES BASADAS EN EL DOMINIO DE UNIÓN AL RECEPTOR DEL VIRUS SARS-COV-2 EN EL DESARROLLO DE UNA INMUNIDAD PROTECTORA

REIVINDICACIONES

1. Uso de una composición vacunal que comprende el dominio de unión al receptor (RBD) del virus SARS-CoV-2 en el tratamiento de pacientes recuperados de COVID19.

2. El uso según la reivindicación 1 donde los pacientes recuperados tienen una inmunidad humoral caracterizada por al menos una de las siguientes condiciones:
   - título de respuesta contra el RBD inferiores a 1/1000,
   - capacidad de inhibición de la interacción RBD-proteína ACE2 inferior al 50% en una dilución 1/100 o
   - título de anticuerpos neutralizantes del SARS-CoV-2 por debajo de 1/160.

3. El uso según la reivindicación 1 donde la composición vacunal se caracteriza porque comprende un conjugado covalente entre el RBD y una proteína portadora que se selecciona del grupo que comprende:
   - el toxoide tetánico,
   - el toxoide diftérico y
   - CRM197.

4. El uso según la reivindicación 1 donde la composición vacunal se caracteriza porque comprende como antígeno el RBD absorbido en $AlOH_3$.

5. La composición vacunal según la reivindicación 4 caracterizada porque adicionalmente comprende un inmunopotenciador.

6. La composición vacunal según la reivindicación 5 caracterizada porque el inmunopotenciador es la vesícula de membrana externa de *Neisseria meningitidis*.

7. El uso según la reivindicación 4 donde el RBD se encuentra en forma de monómero.

8. El uso según la reivindicación 4 donde el RBD se encuentra en forma de dímero.

9. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-8 donde las composiciones vacunales son administradas a los pacientes recuperados en un esquema de inmunización por vía intramuscular o subcutánea que comprende un rango de dosis entre 1-100 µg de RBD, en un rango de 1 a 3 inmunizaciones, a intervalos entre 21 a 28 días.

10. El uso según la reivindicación 9 para obtener plasma hiperimmune con alta capacidad neutralizante del SARS-CoV-2.

11. Uso de una composición vacunal que comprende el RBD del virus SARS-CoV-2 en el desarrollo de una inmunidad protectora efectiva en sujetos previamente inmunizados con vacunas que se seleccionan del grupo que comprende:

    - Adenovirus,
    - Virus inactivados
    - Virus atenuados
    - mRNA

12. El uso según la reivindicación 11 donde se considera inmunidad protectora efectiva cuando se cumplen al menos una de las siguientes condiciones:
    - título de respuesta contra el RBD superiores a 1/1000,
    - capacidad de inhibición de la interacción RBD-proteína ACE2 superior al 50% en una dilución 1/100 o
    - título de anticuerpos neutralizantes del SARS-CoV-2 por encima de 1/160.

13. El uso según la reivindicación 11 donde la composición vacunal se caracteriza porque comprende un conjugado covalente entre el RBD y una proteína portadora que se selecciona del grupo que comprende:
    - el toxoide tetánico,
    - el toxoide diftérico y
    - CRM197.

14. El uso según la reivindicación 11 donde la composición vacunal se caracteriza porque comprende como antígeno el RBD absorbido en $AlOH_3$.

15. La composición vacunal según la reivindicación 14 caracterizada porque adicionalmente comprende un inmunopotenciador.

16. La composición vacunal según la reivindicación 15 caracterizada porque el inmunopotenciador es la vesícula de membrana externa de *Neisseria meningitidis*.

17. El uso según la reivindicación 14 donde el RBD se encuentra en forma de monómero.

18. El uso según la reivindicación 14 donde el RBD se encuentra en forma de dímero.